

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND****PRIORITY  
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 02 MAR 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

BEST AVAILABLE COPY

**Aktenzeichen:** 103 00 023.2

**Anmeldetag:** 03. Januar 2003

**Anmelder/Inhaber:** alcedo biotech GmbH, 28359 Bremen/DE

**Bezeichnung:** Verwendung DNA-bindender Proteine zum  
Aufbau von Geweben

**IPC:** A 61 K, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 9. Februar 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
 Der Präsident  
 Im Auftrag

Dzierzon

# BOHMANN & LOOSEN

## Anwaltssozietät

BOHMANN & LOOSEN, Sonnenstr. 8, 80331 München

Deutsches Patent- und Markenamt

80297 München

Patentanwalt – European Patent Attorney  
Dr. Armin K. Bohmann, Dipl.-Biol.\*<sup>1</sup>

Rechtsanwalt  
Peter Loosen, LL.M.<sup>2</sup>

\*Zugelassener Vertreter vor dem Europäischen Markenamt, Alicante  
Professional Representation at the Community Trademark Office, Alicante

**Zustelladresse:**  
**Sonnenstr. 8**  
**D-80331 München**

Unser Zeichen  
Our ref

B 10028

Ihr Zeichen  
Your ref

Neuanmeldung  
(Patent)

Datum  
Date

03. Januar 2003

**alcedo biotech GmbH, Leobener Str. ZHG, 28359 Bremen**

---

**Verwendung DNA-bindender Proteine zum Aufbau von Geweben**

---

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukte für die Entdifferenzierung von Zellen oder die Reprogrammierung von Zellen, für Prozesse der Geweberegeneration, Wundheilung, Gewebealterung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilen bei Zahn- und Knochenimplantaten, Verfahren zur Regeneration von Geweben, Verfahren zur Entdifferenzierung und/oder Reprogrammierung von Zellen, Trägermaterial umfassend eine derartige Nukleinsäure, deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukt sowie Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial sowie besagte Nukleinsäuren, deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukte.

Die Haut ist ein wichtiges Organ des Säugetierorganismus, insbesondere auch des Menschen. Die Haut besteht aus der Haut im engeren Sinne, d. h. der Cutis, an der sich die Oberhaut oder Epidermis und die Lederhaut, auch als Dermis oder Korium bezeichnet, anschließen sowie daran befindliche Anhangsgebilde wie Haare, Nägel und Drüsen, sowie als Hautelement im weiten Sinne die Unterhaut oder Subcutis. Die von der Haut wahrgenommenen Funktionen

sind ausgesprochen vielfältig. So dient sie als mechanische Abgrenzung gegen die Umwelt, als Wärmeschutzorgan, das durch seine Überschussdurchblutung im Dienste der Blutverteilung und der Temperaturregelung wirksam ist, aber auch durch Isolatorwirkung des Haarkleides und des Fettpolsters sowie durch Verdunstung von Schweiß, womit sie gleichzeitig an der Regulation des Wasserhaushaltes beteiligt ist, als Schutzorgan gegen Bakterien infolge ihres Säureschutzmantels sowie gegen Strahlen infolge Pigmentbildung, und als Energiespeicher bedingt durch das Fettdepot. Darüber hinaus ist die Haut durch die in ihr befindlichen Nervenendorgane ein wichtiges Sinnesorgan. Weiterhin ist sie ein Immunorgan mit differenter Abwehrfunktion. Infolgedessen erfährt die Haut vielfältige Aufmerksamkeit, insbesondere im Rahmen der Wundheilung sowie der Hautalterung.

Die Wundheilung ist ein dynamischer Prozess mit komplexer Wechselwirkung zwischen Zellen, extrazellulärer Matrix, Plasmaproteinen und einer kontrollierten Angiogenese, die durch eine Reihe von Cytokinen und Wachstumsfaktoren koordiniert ist. Unabhängig von der Art der Wunde und dem Ausmaß des Gewebeverlustes lässt sich die Wundheilung grob in die sich zeitlich überlappenden Phasen der inflammatorischen bzw. exsudativen Phase, der proliferativen Phase sowie der Differenzierungs- und Umbauphase einteilen. Die Phaseneinteilung orientiert sich aber an den grundsätzlichen morphologischen Veränderungen im Laufe der Reparationsprozesse, ohne die eigentlich Komplexität der Vorgänge widerzuspiegeln.

Der Prozess der Wundheilung lässt sich quantitativ in eine primäre und sekundäre Wundheilung einteilen, wobei um der therapeutischen Problematik, die sich aus dem Umfang und der Art der Gewebeerstörung ergibt, Rechnung zu tragen, weiter in die verzögerte Primärheilung sowie den chronischen Wundverlauf unterschieden wird. Eine primäre Wundheilung ist zum Beispiel bei glatten, dicht aneinanderliegenden Wundflächen einer Schnittwunde ohne nennenswerten Substanzverlust und ohne Einlagerung von Fremdkörpern in einem gut mit Blutgefäßen versorgten Geweben der Fall. Eine primäre Wundheilung ist üblicherweise bei chirurgisch gesetzten Wunden oder bei Gelegenheitswunden durch scharfkantige Gegenstände gegeben. Ist aufgrund der Wundentstehung mit einer Infektion zu rechnen, tritt die verzögerte Primärheilung ein. Manifestiert sich eine Infektion, so wird die Wunde als sekundärheilend eingestuft. Eine Sekundärheilung ist bei größeren Defekten, bei denen ein Granulationsgewebe aufgebaut werden muss oder wenn eine Infektion die direkte Vereinigung der Wundränder nicht zulässt, gegeben. Ist die Heilung einer Wunde nicht innerhalb von acht Wochen abge-

schlossen, so spricht man von einem chronischen Heilungsverlauf. Eine chronische Wunde kann in jeder Wundheilungsphase entstehen und entwickelt sich meistens aus fortschreitender Gewebeerstörung infolge von Geweberkrankungen unterschiedlicher Genese, lokalen Druckschäden, Strahlenschäden oder Tumoren.

Eine weitere Unterscheidung der Wundheilung kann basieren auf der Unterscheidung in akute Wunden und chronische Wunden. Zu den akuten Wunden zählen die akuten traumatisch bedingten Wunden bis hin zu komplexen traumatischen Defekten, die thermischen und chemischen Verletzungen/Verbrennungen und Inzisionen/OP-Wunden.

Bei akuten traumatisch bedingten Wunden erfolgt für den Fall, dass sich die Wundränder spannungsfrei adaptieren lassen, gegebenenfalls nach erfolgter Wundexzision, ein primärer Wundverschluss durch Naht, Klammern oder Wundnahtstreifen. Bei Wunden, die eine potentielle Infektionsgefährdung aufweisen, wird die Wunde dagegen zunächst mit sterilen feuchten Verbänden offen gehalten, bis eine Infektion ausgeschlossen werden kann. Bei sekundär heilenden und komplexeren Wunden ist der Wundverschluss wesentlich vielschichtiger.

Bei thermischen und chemischen Wunden, d. h. solchen, die durch Einwirkung von Hitze und Kälte oder gewebeschädigenden Strahlen, Säuren oder Laugen entstehen, erfolgt die Behandlung entsprechend dem Schädigungsmuster. Bei schwer verbrannten Patienten erfolgt zum Beispiel zunächst eine Nekrektomie mit einem anschließenden chirurgischen Ersatz durch ein Hauttransplantat. Dabei werden für den Fall, dass die Wunde nicht transplantierbar ist oder durch die ausgedehnten Verbrennungen nicht mehr genügend Spenderstellen zur Verfügung stehen, sogenannte Allo- und Xenotransplantate verwendet. Bei ausreichend vorhandenen Spenderarealen kann auf permanente autologe Hauttransplantation zurückgegriffen werden. Eine Sonderform ist dabei die autologe Keratinocyten-Transplantation.

Chronische Wunden sind sekundär heilende Wunden, die trotz kausaler und sachgerechter lokaler Therapie innerhalb von acht Wochen nicht abheilen. Obgleich sich chronische Wunden jederzeit aus einer akuten Wunde entwickeln können, stellen die überwiegenden Fälle von chronischen Wunden das letzte Stadium einer fortschreitenden Gewebeerstörung dar, die ausgelöst wird durch venöse, arterielle oder stoffwechselbedingte Gefäßleiden, Druckschädigungen, Strahlenschäden oder Tumoren. Die verschiedenen Typen chronischer Wunden wer-



den durch unterschiedliche Pathologien hervorgerufen, wobei die Wunden biochemisch betrachte als ähnlich gelten. Zu den lokalen Faktoren, die die Wundheilung beeinträchtigen, zählen unter anderem Fremdkörper, Ischämie, wiederholte Traumata und Infektionen. Des Weiteren können systemische Faktoren wie beispielsweise erhöhtes Alter, Unter- und Fehlernährung, Diabetes sowie Nierenerkrankungen einen Einfluss auf die Wundheilung haben. Zu den volkswirtschaftlich relevantesten chronischen Wundheilungsstörungen zählen, unter anderem, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, das diabetische Ulcus, das Dekubitalulcus und die chronische posttraumatische Wunde.

Neben akuten und chronischen Wunden tritt als wesentliche Veränderung der Haut die Hautalterung auf, die grundsätzlich in das Zeitaltern und das Umweltauern unterteilt werden kann. Der Begriff Zeitaltern beschreibt die auf die normalen Alterungsvorgänge der Haut bezogenen Veränderungen, die zu einer Verdünnung der Schichten der Haut und zu einem Nachlassen der Funktionen der Hautdrüsen führen. Dies bedingt mit zunehmendem Alter eine dünne, trockene, feinrunzelige Haut. Altersbedingte Fältchen und Falten sind die Folge einer Abnahme bzw. eines Verlustes des Kollagens und der elastischen Fasern in der Lederhaut. Des Weiteren wird die Integrität von gealterter Haut leichter unterbrochen und diese regeneriert langsamer, so dass der Organismus einem größeren Infektionsrisiko ausgesetzt ist. Eine altersbedingte Verlangsamung und Verminderung der Zellerneuerung wird unter anderem durch hormonelle Veränderungen und erbliche Faktoren beeinflusst. Umwelteinflüsse haben jedoch einen entscheidenden Einfluss auf diesen Alterungsprozess, den sie beschleunigen und verstärken können.

Bei der Umweltauern kommt insbesondere dem Ausmaß an lebenslanger UV-Strahlung eine große Bedeutung zu, so dass man hier auch von „photoaging“ spricht. Aber auch andere Faktoren, wie eine eingeschränkte Durchblutung der Haut durch Nikotinabusus, begünstigt die Alterungsvorgänge. Während der UV-B-Anteil des Sonnenlichts in erster Linie Schäden an den Zellen der Oberhaut auslöst und damit zu Hautkrebsvorstufen (sog. aktinischen Keratosen) und Hautkrebs (Basalzellkarzinome, Plattenepithelkarzinome, Melanome) führt, dringen UV-A-Strahlen bis in die Lederhaut und zerstören hier das ansässige Hautbindegewebe (Elastose). Dies führt im Gesicht, aber auch im Nacken zu einer schlaffen, stark runzeligen, in grobe Falten gelegten Haut. Eine weitere Folge einer Dauer-UV-Belastung sind die sog. Altersflecken, die bevorzugt an lichtexponierten Stellen wie im Gesicht und an den Handrücken

auftreten. Im Gegensatz zu dieser Hyperpigmentierung kann der Lichteinfluss auch zu Depigmentierung (Hypomelanosis guttata) führen. Zusammenfassend werden diese Phänomene als chronischer Lichtschaden bezeichnet, der als ein irreversibler Prozess eingestuft wird.

Die Behandlung der verschiedenen Wunden kann grundsätzlich in eine passive und eine aktive Wundtherapie eingeteilt werden. Als Sonderform können auch sog. Hautersatzverfahren verwendet werden. Bei der passiven Wundtherapie werden zum einen inaktive, textile Verbandstoffe verwendet, die als reines Abdeckungsmaterial dem Infektionsschutz dienen. Interaktive Wundauflagen dienen im Unterschied zu den inaktiven Verbandstoffen häufig dazu, ein feuchtes Wundmilieu zu schaffen und damit den Heilungsprozess zu beschleunigen. Dabei werden, unter anderem, Hydrokolloide, Hydrogele, Hydropolymere und Schaumverbände sowie Kalziumalginat verwendet. Der Nachteil dieser passiven Wundtherapie liegt darin, dass das Verbandsmaterial die aktive Heilung von Problemwunden nicht befördert, insbesondere bei chronischen Wunden, die häufig als therapieresistent gelten.

Im Stand der Technik sind verschiedene Wachstumsfaktoren beschrieben, die im Rahmen der aktiven Wundtherapie verwendet werden und die an einzelnen Zielmolekülen der Wundheilung angreifen. Dazu zählen, unter anderem, transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF beta), von Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Interleukin 1 beta, Granulocyten-Macrophagenkolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und Gerinnungsfaktor XIII. Die in diese Verbindungen gesetzten Hoffnungen wurden jedoch oftmals nicht erfüllt, was zumindest zum Teil in der Komplexität des Wundheilungsprozesses begründet liegt.

Bei den Hautersatzverfahren zur Abdeckung von Wunden wird zwischen temporärem und permanentem Hautersatz unterschieden. Der temporäre Hautersatz kann entweder allogenem biologischen Ursprungs sein, beispielsweise Fremdhaut wie dezellulierte humane Leichenlederhaut in Kombination mit Keratinocyten sheets oder Spalthaut, xenogen biologischen Ursprungs sein, beispielsweise equine Kollagenfibrillen oder bovine Kollagenschwämme, oder eine Kombination aus synthetischem und biologischem Material darstellen, wie beispielsweise Folien aus Silikon oder Nylon kombiniert mit Kollagenmatrizes und/oder Fibroblasten. Der permanente Hautersatz kann dabei ein autologes Hauttransplantat sein oder auf Zellkulturen zurückgehen.

Infolge der unterschiedlichen physiologischen Vorgänge bei der Wundheilung einerseits und Hautalterung andererseits werden zur Bekämpfung der Hautalterung durch sog. Anti-Aging-Produkte andere therapeutische bzw. kosmetische Ansätze verfolgt. Nach einer Studie der Stiftung Warentest (test Spezial Kosmetik 2002, Seite 17-19, Sonderheft) weisen die meisten auf dem Markt erhältlichen Präparate keine oder nur eine geringe Effizienz auf, insbesondere was die Glättung der Falten anbelangt. Dabei sind bei Anti-Aging-Produkte faktisch nur jene Strategien wirksam, die auf eine Verlangsamung der Alterungsprozesse abzielen. Entsprechend werden Vitamine und Antioxidanzien eingesetzt, um die Haut vor externen, umweltbedingten Faktoren, wie zum Beispiel UV-B-Strahlung oder Luftverschmutzung, zu schützen. Daneben wird den Falten und anderen kleineren Hautfehlern durch kosmetischen Operationen entgegengewirkt. Dies ist jedoch mit einem nicht unerheblichen apparativen Aufwand verbunden. Eine weitere Technik, die derzeit zur Beseitigung von Falten angewandt wird, ist die Injektion von Botulintoxin. Botulintoxin führt, in die Bereiche der Falten der Haut injiziert, zu einer Vergiftung und somit zur Lähmung der Muskelzellen, wodurch insgesamt eine Straffung der Haut erreicht wird. Neben den ungeklärten Nebenwirkungen dieser Behandlung ist ein weiterer Nachteil der, dass bei etwa 5 % der Patienten mit der Zeit die Therapie in Folge neutralisierender Antikörper nicht mehr anspricht.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, um Zellen, insbesondere mesenchymale Zellen, aber auch epitheliale Zellen, in einen Zustand zu überführen, der diesen erlaubt, sich zu differenzieren, ggf. sich zu dedifferenzieren und/oder zu wachsen. In einem weiteren Aspekt liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Mittel zur Förderung bzw. Initiierung der Wundheilung bereitzustellen. Schließlich ist es eine der Aufgaben der vorliegenden Erfindung ein Mittel bereitzustellen, welches der Hautalterung entgegenwirkt.

Erfindungsgemäß die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe in einem ersten Aspekt gelöst durch eine Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten

umfasst, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Verwendung in vitro ebenso wie in vivo erfolgen kann.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem zweiten Aspekt gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Entdifferenzierung von Zellen und Reprogrammierung von Zellen umfasst, für Gewebeaufbau und/oder Geweberegeneration, insbesondere beruhend auf der Grundlage einer Entdifferenzierung und/oder Differenzierung des aufzubauenden oder zu regenerierenden Gewebes, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Verwendung in vitro ebenso wie in vivo erfolgen kann.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem dritten Aspekt gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration erforderlich macht, Wundheilung erforderlich macht, die mit Gewebealterung einhergeht, Wundheilungsstörung, Herzinfarkt, die Zahn- und Knochenimplantate erforderlich macht, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt einzeln oder in Kombination zur Herstellung eines Mittels verwendet wird, das verwendet werden kann, um die Gewebealterung zu beeinflussen, insbesondere die Gewebealterung zu unterdrücken oder zu verlangsamen. Weiterhin kann ein Mittel, welches die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt einzeln oder in Kombination enthält, verwendet werden bei oder für Zahn- und Knochenimplantaten, insbesondere zur Förderung des Einwachsens der Zähne bzw. Implantate.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem vierten Aspekt gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt zur Herstellung eines kosmetischen Produktes, bevorzugterweise eines kosmetischen Produktes für die Geweberegeneration, Wundheilung, Gewebealterungsverhinderung und/oder Gewebe-

verjüngung, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-Protein umfasst. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Gewebeerneuerung vollständig oder teilweise verhindert wird oder zumindest verlangsamt wird.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe in einem fünften Aspekt gelöst durch die Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die akute Wunden und chronische Wunden umfasst, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

In einer Ausführungsform des fünften Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die akute Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden und OP-Wunden umfasst.

In einer Ausführungsform des fünften Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die chronische Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Decubitus, Ulcus cruris, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetischer Ulcus, Decubitalulcus, chronische posttraumatische Wunde und diabetischer Fuß umfasst.

In einer Ausführungsform des ersten bis fünften Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass das basische DNA-bindende Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die High Mobility Group-Proteine umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform des ersten bis fünften Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA, HMGB und HMGN umfasst.

In einer noch weiteren Ausführungsform des ersten bis fünften Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass das High Mobility Group-Protein ein Protein der HMGA-Familie ist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA1a, HMGA1b und HMGA2 umfasst.

In einer Ausführungsform des ersten bis fünften Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuren, die Nukleinsäuren gemäß-SEQ ID NO. 31 bis SEQ ID NO. 64 und deren jeweiligen Derivate umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform des ersten bis fünften Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass das Translationsprodukt aus der Gruppe ausgewählt ist, die Polypeptide mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1 bis SEQ ID NO. 30 und deren jeweiligen Derivate umfasst.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Protein eine Modifikation aufweist, wobei die Modifikation aus der Gruppe ausgewählt ist, die Phosphorylierung und Acetylierung umfasst.

In einem sechsten Aspekt wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Regeneration von Gewebe umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt und
- c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst, und optional

- d) Erhalten oder Wiedergewinnen des regenerierten Gewebes oder einer Zwischenstufe davon.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Verfahren ein in vitro-Verfahren ist. In einer alternativen Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Verfahren ein in vivo-Verfahren ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass das zu regenerierende Gewebe verschieden ist von dem in Schritt a) bereitgestellten Gewebe. In einer dazu alternativen Ausführungsform ist vorgesehen, dass das zu regenerierende Gewebe identisch ist von dem in Schritt a) bereitgestellten Gewebe

In einer weiteren Ausführungsform des sechsten Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass das zu regenerierende Gewebe und/oder das in Schritt a) bereitgestellte Gewebe unabhängig voneinander ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Hautgewebe, Fettgewebe, Knorpelgewebe, Muskelgewebe, Zellen des Blutes und des Blutbildes und Nervenzellen umfasst.

In einer weiteren Ausführungsform des sechsten Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie sie hierin beschrieben ist.

In einem siebten Aspekt wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Entdifferenzierung und/oder Reprogrammierung von Zellen umfassend die folgenden Schritte:

a) Bereitstellen einer oder mehrerer Zellen,

b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, und

c) Inkubieren der Zelle und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Verfahren ein in vitro-Verfahren ist. In einer alternativen Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Verfahren ein in vivo-Verfahren ist.

In einer weiteren Ausführungsform des siebten Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass das Verfahren weiterhin den Schritt umfasst:

d) Erhalten einer entdifferenzierten und/oder reprogrammierten Zelle.

In einer noch weiteren Ausführungsform des siebten Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die entdifferenzierte Zelle(n) und/oder reprogrammierte Zelle(n) und/oder die gemäß Schritt a) bereitgestellte(n) Zelle(n) unabhängig voneinander ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Zellen der Epidermis, Zellen der Haut, Zellen des Fettgewebes, Zellen des Knorpelgewebes, Zellen des Muskelgewebes, Zellen des Blutes, Zellen des blutbildenden Gewebes und Nervenzellen umfasst.

In einer bevorzugten Ausführungsform des siebten Aspekts der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

In einem achten Aspekt wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch eine pharmazeutische Formulierung umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wie hierin beschrieben, und einen pharmazeutisch geeigneten Träger.

In einem neunten Aspekt wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch ein Trägermaterial umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.



In einer Ausführungsform ist dabei vorgesehen, dass das Trägermaterial aus einem Material besteht, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Zellulose, Agarose, Kollagen, Silikon, Silicium, Kunststoffe, Gele, Hydrogele, Matrices basierend auf Fibrin, Kustseidenfasern, Hydrokolloide, Lipokolloide, Polyurethan, Polyurethanharz, Gips, synthetische Biomaterialien, thermoplastische Kunststoffe, Zinkleim, Polsterschaum, Polyisobutylen, Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika und Feuchthaltemittel umfasst.

In einer Ausführungsform ist dabei vorgesehen, dass das Trägermaterial als Implantat oder zur Wundheilung dient.

In einem zehnten Aspekt wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial und eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, dass das Deckmaterial aus der Gruppe ausgewählt ist, die Hydrokolloid-Verbände, Calciumalginat-Verbände, Aktivkohlekompressen/auflagen, Schaumstoffwundauflagen, Folienverbände, Transparentverbände, Silikonschaumverbände, Vliesstoffwundauflagen, Hydrozelluläre Wundverbände, Hydroselektive Wundauflagen, Absorbierende Wundkissen, Sprühverbände, Kunstseidengaze, Baumwollgaze, Paraffingazeverbände, silberbeschichtete Wundverbände und Hydropolymer-/Schaumverbände umfasst.

In einem elften Aspekt wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch eine kosmetische Formulierung umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben, und eine Trägerphase, wobei die Trägerphase aus der Gruppe ausgewählt ist, die Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogele, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays umfasst.

In einem zwölften Aspekt wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem verursachten Reaktion.

In einem dreizehnten Aspekt wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung;
- c) Testen der Referenzverbindung im Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung;
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion; und

f) Vergleich der Reaktion von der Referenz-Verbindung im Testsystem mit der Reaktion von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem.

In einem vierzehnten Aspekt wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung, wobei die Referenz-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen der Kandidaten-Verbindung; und
- e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Referenz-Verbindung bestimmt wird.

In einem fünfzehnten Aspekt wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe gelöst durch zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;

- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung, wobei die Kandidaten-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung; und
- e) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird.

In einer Ausführungsform der Verfahren nach dem zwölften bis fünfzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass das Testsystem ein *in vitro* Testsystem oder ein *in vivo* Testsystem ist.

In einer weiteren Ausführungsform der Verfahren nach dem zwölften bis fünfzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Förderung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Förderung des Prozesses ist, wenn die Reaktion der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem gleich oder stärker ist als die Reaktion der Referenz-Verbindung.

In einer noch weiteren Ausführungsform der Verfahren nach dem zwölften bis fünfzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Inhibierung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zum Inhibieren des Prozesses ist, wenn die von der Kandidaten-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems eine geringere Reaktion ist als die von der Referenz-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems.

In bevorzugten Ausführungsform der Verfahren nach dem zwölften bis fünfzehnten Aspekt der vorliegenden Erfindung ist vorgesehen, dass die Referenz-Verbindung eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt ist, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindenden Proteine umfasst, insbesondere wie hierin beschrieben.

Der vorliegenden Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, dass basische DNA-bindende Proteine wie die HMG-Proteine dazu führen, eine Zelle in einen Zustand zu versetzen, der eine Entdifferenzierung, eine Differenzierung und/oder Um-Differenzierung oder eine Kombination der Vorgänge erlaubt. Konkret erfolgt unter dem Einfluss der besagten Proteine eine Entdifferenzierung oder Reprogrammierung einer Zelle, die sodann erlaubt, dass sich die Zelle ggf. in einen Zustand differenziert, der dem der Ausgangszelle oder dem einer anderen, d. h. von der Ausgangszelle verschiedenen Zelle entspricht. In einem jeden Fall werden die Zellen unter dem Einfluss der besagten Proteine in einen reaktivierten Zustand versetzt. Dieser den verschiedenen Anwendungen und Verfahren der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Mechanismus ist dabei in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die besagten Proteine als sog. Masterproteine eine Vielzahl von Genen kontrollieren und den funktionalen Zustand der Zelle bestimmen. Als Modulatoren von Transkriptionsfaktorkomplexen können sie grundsätzlich sowohl positiv als auch negativ auf die Expression ihrer Zielgene einwirken. Dazu binden sie mehr struktur- als sequenzspezifisch an die entsprechenden Promotoren und biegen die DNA, so dass entweder die Bindung der Transkriptionsfaktoren vermittelt wird oder die Transkriptionsfaktoren ihre Fähigkeit verlieren, in diesem Bereich mit der DNA zu assoziieren. Aufgrund dieser Eigenschaft werden die besagten Proteine auch als architektonische Transkriptionsfaktoren bezeichnet. Weiterhin haben die vorliegenden Erfinder festgestellt, dass die besagten Proteine und insbesondere die HMG-Proteine in der Embryonal- und Fetalentwicklung am Zell- und Gewebeaufbau beteiligt sind, während sie in den meisten differenzierten Zellen nach der Geburt nicht mehr nachweisbar sind. Während der frühen Embryogenese kann die mRNA einiger HMG-Proteine in nahezu allen Geweben detektiert werden. In der späteren Embryogenese ist die Expression auf mesenchymale Derivate und einige epitheliale Zellgewebe beschränkt.

Die im Stand der Technik angeführten, zur Wundheilung verwendeten hochmolekularen Verbindungen, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Cytokine, Gerinnungsfaktoren und der-

gleichen, greifen selektiv in das Geschehen der Wundheilung bzw. Hautalterung ein. Bei einer Verwendung der basischen DNA-bindenden Proteine wie der HMG-Proteine kann jedoch infolge des zentralen Wirkmechanismus der besagten Proteine sehr zu Beginn des Differenzierungszustandes eine ganzheitliche Regeneration des Gewebes bzw. der einzelnen Zellen realisiert werden. Die überraschend beobachtete Wirkung der besagten Proteine zu Zwecken der Wundheilung im weitesten Sinne, wie sie hierin definiert ist, beruht dabei auf den folgenden Abläufen bzw. Mechanismen, wobei darauf abgestellt werden kann, dass die besagten Proteine sowohl in der proliferativen wie der Differenzierungs- und Umbauphase des Wundheilungsprozesses, einschließlich Aufbauen des Granulationsgewebes, Stimulation der Angiogenese sowie Proliferation und Migration von Epithelzellen, eingreifen und für diese Prozesse oder in Verfahren, die auf diesen Prozessen beruhen, verwendet werden können. Entsprechend ergibt sich eine Verwendung der besagten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren bei Krankheiten, die mit diesen Prozessen bzw. Phasen verbunden sind, einhergehen, darauf zurückgreifen und/oder auf diese kausal oder symptomatisch zurückgehen.

Eine wesentliche Ursache chronischer Wunden ist ein Ungleichgewicht zwischen Reparaturprozessen, die zur Bildung von neuem Gewebe führen und destruktiven Prozessen, die zur Entfernung des geschädigten Gewebes führen. Beispielsweise kann eine erhöhte Proteaseaktivität, zum Beispiel durch Überexpression von Matrixmetalloproteasen zu einer fehlgesteuerten Degradierung der extrazellulären Matrix führen. Durch die u. a. proliferationsfördernde Wirkung der basischen DNA-bindenden Proteine und insbesondere der HMG-Proteine kann das Ungleichgewicht zwischen der Synthese und Degradierung der extrazellulären Matrix und daraus resultierende Verschiebung des Wundgleichgewichts in Richtung destruktiver Prozesse aufgehoben werden. Gegenüber dem Einsatz einzelner exogener Wachstumsfaktoren, die meistens eine spezifische Signalkaskade induzieren, besitzen die besagten Proteine den entscheidenden Vorteil, dass sie als architektonische Transkriptionsfaktoren eine ganze Reihe unterschiedlicher proliferationsfördernder Signaltransduktionswege ansprechen und somit ein breiteres Wirkungsspektrum aufweisen. Die besagten Proteine können durch die Synthese einer Reihe von funktionellen Proteinen in unterschiedlichen Zellen, wie zum Beispiel Keratinocyten, Fibroblasten und Endothelzellen, induzieren. Die besagten Proteine greifen darüber hinaus an einem späteren Punkt in die Signalkaskaden ein als die initial wirkenden exogenen Wachstumsfaktoren, die häufig vermutlich durch den hohen Proteasegehalt chronischer Wundflüssigkeit im Übrigen sehr schnell abgebaut werden.

Für den Heilungsprozess ist weiterhin eine ausreichende Durchblutung des Wundbereichs von essentieller Bedeutung. Ist dieser stark eingeschränkt, kann ein ausreichender Wundstoffwechsel nicht gewährleistet werden und dies zu einem chronischen Heilungsverlauf führen. Die basischen DNA-bindenden Proteine und insbesondere die HMG-Proteine fördern durch die Induktion der Proliferation von Endothelzellen auch die Angiogenese im Wundbett. Schließlich spielt bei Wundheilungsstörungen die Seneszenz von Zellen eine besondere Rolle. Ein zunehmendes Alter von dermalen Fibroblasten korreliert mit einem reduzierten Potential zur Proliferation. Fibroblasten in chronischen Wunden weisen eine verschlechterte Reaktion auf Wachstumsfaktoren auf, die vermutlich auf eine steigende Anzahl an seneszenten Zellen zurückzuführen ist. Die besagten Proteine besitzen die Fähigkeit, diese Zellen durch ihre reprogrammierende oder „verjüngende“ Eigenschaften wieder in einen aktiven Zustand zu versetzen und ihre Proliferation zu reaktivieren.

Schließlich stellt eine stark eingeschränkte Epithelisierung eine weitere Störung im Heilungsprozess von chronischen Wunden dar, wodurch die Heilung nicht zum Abschluss gebracht werden kann. Ein Faktor ist dabei die eingeschränkte Migration von Epithelzellen am unmittelbaren Ulcusrand. Die vorliegenden Erfinder haben gezeigt, dass HMG-Proteine die Mobilität von Zellen erhöhen können, so dass auch im Hinblick auf die Migration von Epithelzellen eine positive Wirkung durch die HMG-Proteine auftritt.

Wie hierin verwendet kommt den basischen DNA-bindenden Proteinen die hierin beschriebenen Funktionen zu. Eine besonders bevorzugte Gruppe der basischen DNA-bindenden Proteine sind dabei die sog. High-Mobility-Group (HMG)-Proteine. Namensgebend für diese Proteine ist ihre hohe elektrophoretische Mobilität in Polyacrylamidgelen. Sie gehören zu den chromosomalen Nicht-Histon-Proteinen und sind primär nicht über ihre Proteinfunktion, sondern unter den Gesichtspunkten chemischer und physikalischer Eigenschaften definiert. Alle Mitglieder dieser Proteine sind aus Chromatin durch 0,35 M NaCl extrahierbar, sind in 2 bis 5 %iger Perchlorsäure löslich, weisen einen hohen Gehalt von geladenen Aminosäuren und ein Molekulargewicht von unter 30.000 Da auf. Die HMG-Proteine werden unter Berücksichtigung von Sequenzhomologien und Sequenzmotiven in drei Subgruppen unterteilt, nämlich die HMGB (früher HMG-1/2)-Familie, die HMGN (früher HMG-14/17)-Familie und die HMGA (früher HMG-I/-Y/-C)-Familie.

Die Mitglieder der HMGB-Familie gehören zu den häufigsten HMG-Proteinen. Das durchschnittliche Molekulargewicht beträgt maximal 25.000 Da.

HMGB-Proteine bestehen aus drei Domänen, wobei die zwei konservativen, stark Sequenz homologen Domänen die unspezifische DNA-bindende Region der Proteine darstellen. Dieses funktionelle Motiv bezeichnet man als HMG-Box. HMGB-Proteine enthalten zwei dieser HMG-Boxen, nämlich Box A und B. Der C-terminale Bereich des HMGB1-Proteins bildet die Protein-bindende Domäne der HMGB-Proteine. Neben den HMGB-Proteinen gibt es eine große Anzahl anderer Proteine, bei denen sich HMG-Boxen nachweisen lassen. Zu dieser Gruppe von Proteinen gehören SRY, SOX-Proteine LEF1 und UBF1 (A. D. Baxevanis und D. Landsman: The HMG-1 box protein family: classification and functional relationships. NAR 23, 2002, 1604-1613). Die HMGB-Proteine stellen strukturelle Komponenten des Chromatins dar und sind an der transkriptionellen Regulation beteiligt.

Die Mitglieder der HMGN-Familie werden in allen höheren Eukaryonten exprimiert. Ihr Molekulargewicht liegt zwischen 10.000 und 20.000 Da. Sie sind die einzigen Nicht-Histon Proteine, die mit einer höheren Affinität mit ihrer positiv geladenen Nukleosomen-Bindungs-Domäne (NBD), an den Nukleosomen-Kern als an Histon-freie DNA binden. Diese Bindungsdomäne umfaßt die Aminosäuren 12-41 des HMGN1 Proteins und die Aminosäuren 17-47 des HMGN2 Proteins und wurde auch in der Sequenz anderer Proteine gefunden; so enthält z. B. NBP45 ein NBD-Motiv in seiner primären Sequenz.

Die HMGA-Familie besteht aus drei Mitgliedern, nämlich HMGA1a und HMGA1b, die beide Splicevarianten eines Gens darstellen und dem verwandten, von einem anderen Gen codierten Protein HMGA2. Das durchschnittliche Molekulargewicht der Proteine der HMGA-Familie liegt zwischen 10.000 und 12.000 Da. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie findet man zu meist nur in undifferenzierten embryonalen Zellen, in neoplastischen Zellen sowie in der exponentiellen Wachstumsphase differenzierter Zellen. Im Unterschied dazu sind sie in differenzierten Zellen des Normalgewebes nicht oder nur in geringen Konzentrationen nachweisbar.



Proteine dieser Familie besitzen jeweils 3 separate DNA-Bindungsdomänen, sowie eine saure Proteinbindungsdomäne. Die HMGA-Proteine binden an die kleine Furche AT-reicher DNA. Bei Genen, deren Promotor/Enhancer-Sequenzen in der Nähe solcher HMGA-Bindungsstellen lokalisiert sind, kann die Bindung von HMGA zu einer Beeinflussung der Transkription führen. So spielt die Acetylierung von HMGA1 eine entscheidende Rolle bei der Regulierung des Enhanceosomkomplexes zur Transkription des Interferon-Beta (IFN-beta)-Gens. Weitere posttranslationale Modifikationen der HMGA-Proteine sind die Phosphorylierung, welche abhängig vom Zellzyklus ist bzw. die ADP-Ribosylation.

Grundsätzlich sind alle HMG-Proteine, sowohl die derzeit bekannten als auch zukünftig noch aufzufindenden HMG-Proteine, im Rahmen der vorliegenden Erfindung anwendbar, insbesondere nach Durchführung der hierin beschriebenen Experimente, um im Einzelfall zu bestimmen, ob das konkrete HMG-Protein die entsprechenden erfindungsgemäßen Eigenschaften und damit das Verhalten in der jeweiligen Anwendung zeigt.

Derzeit sind ca. 15 HMG-Proteine bekannt. Besonders bevorzugt für die hierin beschriebenen Verwendungen und Anwendungen sind dabei die Proteine der HMGA-Familie.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass aberante Transkripte der HMG-Proteine verwendet werden. Derartige trunkierte HMG-Proteine sind in der Literatur beschrieben, unter anderem auch in der internationalen Patentanmeldung WO 96/25493 oder WO 97/23611, deren Offenbarung hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird.

Bevorzugterweise weisen trunkierte HMG-Proteine, wie sie im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, die mindestens Exon 1, bevorzugterweise mindestens Exons 1 bis 3 des HMGA2-Gens sowie weitergehende Aminosäuren, die kodiert werden von Sequenzen, die aus den Regionen unterschiedlicher chromosomaler Translokationspartner des Chromosomes 12 stammen, auf. Sowohl diese trunkierten Formen als auch weitere Abwandlungen der HMG-Proteine, wie z. B. HMGA2-LPP; HMGA2-RAD51L1 (beschrieben beispielsweise in Tkachenko, A et al., Cancer Res 997; 57 (11): 2276 - 80; Schoenmakers EF et al.; Cancer Res 1999 59(1): 19-23) HMGA1-LAMA4 (beschrieben beispielsweise in Schoenmakers EF et al. aaO; Tkachenko, A et al., aaO) und SP100-HMGB1, insbesondere HMGA1a, HMGA1b sowie HMGA2 können in Form von Derivaten vorliegen. Derartige

Derivate können beispielsweise durch posttranslationale Modifikation, wie beispielsweise Acetylierung oder Phosphorylierung herstellbar sein, oder aber auch durch Konjugation an andere Moleküle modifiziert sein. Derartige andere Moleküle können beispielsweise aus der Gruppe ausgewählt sein, die Zucker, Lipide, Peptide und kleine organische Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 1000 umfasst.

Bevorzugte HMG-Proteine, die im Rahmen der verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind ein jedes einzelne der folgenden, in Tabelle 1 angegebenen Proteine, die mit den SEQ ID NOs. 1 bis 30 bezeichnet werden. Tabelle 1 gibt dabei einen Überblick unter Angabe der SEQ ID NOs., der Aminosäurelänge, der Zugangsnummer des Datenbankeintrages, sofern vorhanden, sowie des Aufbaus der Exonstruktur und daran angefügter, gegebenenfalls vorhandener zusätzlicher Aminosäuren.

**Tabelle 1: Bevorzugte HMG-Proteine**

<b>SEQ ID NO.</b>	<b>Name des Proteins</b>	<b>Proteinlänge</b>	<b>Exon-Struktur</b>	<b>Zugansnr.</b>
1	HMGA1a-Protein	107 Aminosäuren		X14957
2	HMGA1b-Protein	96 Aminosäuren		X14958
3	HMGA2-Protein	109 Aminosäuren		P52926
4	trunkiertes HMGA2	83 Aminosäuren	Exon 1-3	
5	trunkiertes HMGA2: IC113 ORF	90 Aminosäuren	Exon 1-3 + 7 Aminosäuren	U29113
6	trunkiertes HMGA2: IC117 ORF	96 Aminosäuren	Exon 1-3 + 13 Aminosäuren	U29117
7	HMGB1-Protein	215 Aminosäuren		S02826
8	trunkiertes HMGA2	147 Aminosäuren	Exon 1-3 + 64 Aminosäuren	U29119
9	trunkiertes HMGA2	106 Aminosäuren	Exon 1-3 + 23 Aminosäuren	U29112

# BOHMANN & LOOSEN

22

10	trunkiertes HMGA2	92 Aminosäuren	Exon 1-3 + 9 Aminosäuren	H98218
11	trunkiertes HMGA2	96 Aminosäuren	Exon 1-4 + 2 Aminosäuren	U29120
12	trunkiertes HMGA2	118 Aminosäuren	Exon 1-4 + 24 Aminosäuren	U29115
13	trunkiertes HMGA2	95 Aminosäuren	Exon 1-4 + 1 Aminosäure	U29114
14	HMGA1a AT-Hook 1	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 5, Position im Protein AS 21-31	X14957
15	HMGA1a AT-Hook 2	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 6, Position im Protein AS 53-63	X14957
16	HMGA1a AT-Hook 3	12 Aminosäuren	Codiert von Exon 7, Position im Protein AS 78-89	X14957
17	HMGA1b AT-Hook 1	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 5, Position im Protein AS 21-31	X14958
18	HMGA1b AT-Hook 2	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 6, Position im Protein AS 42-52	X14958
19	HMGA1b AT-Hook 3	12 Aminosäuren	Codiert von Exon 7, Position im Protein AS 67-78	X14958
20	HMGA2 AT-Hook 1	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 1, Position im Protein AS 24-34	P52926
21	HMGA2 AT-Hook 2	11 Aminosäuren	Codiert von Exon 2, Position im Protein AS 44-54	P52926
22	HMGA2 AT-Hook 3	21 Aminosäuren	Codiert von Exon 3, Position im Protein AS 71-91	P52926
23	HMGB1 HMG-BOX A (LARGE)	78 Aminosäuren	Codiert von Exon 2 + 3, Position im Protein AS 6-83	S02826

24	HMGB1 HMG-BOX A (SMALL)	71 AS (P09429)	Codiert von Exon 2 + 3, Position im Protein AS 9-79	P09429
25	HMGB1 HMG-BOX A (MEDIUM)	73 Aminosäuren	Codiert von Exon 2 + 3, Position im Protein AS 6-78	NP_002119
26	HMGB1 HMG-BOX B (LARGE)	75 Aminosäuren	Codiert von Exon 3 - 5, Position im Protein AS 92-166	S02826
27	HMGB1 HMG-BOX B (MEDIUM)	69 Aminosäuren	Exon 3 - 5, Positi- on im Protein AS 95-163	P09429
28	HMGB1 HMG-BOX B (SMALL)	49 Aminosäuren	Codiert von Exon 3 + 4, Position im Protein AS 95-143	NP_002119
29	SP100-HMGB1	181 Aminosäuren	Alternatives Exon (HMGB1L3)	AF076675
30	HMGA2-LPP	225 Aminosäuren	Exon 1-3 + 142 Aminosäuren	

Die im Rahmen der verschiedenen Aspekte der vorliegenden Erfindung verwendeten Nukleinsäuren sind dabei solche Nukleinsäuren bzw. deren Transkriptionsprodukte, die für die basischen DNA-bindenden Proteine, wie sie hierin beschrieben sind, codieren und hierin auch insgesamt als die für die DNA-bindenden Proteine codierenden Nukleinsäuren bezeichnet werden, insbesondere für die vorstehend beschriebenen HMG-Proteine und deren Derivate. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine jegliche Nukleinsäure umfasst ist, die für die vorstehend genannten DNA-Proteine codiert. Entsprechende Nukleinsäuren können durch die Degeneriertheit des genetischen Codes umfasst werden. Besonders bevorzugte Nukleinsäuren sind dabei jene, wie sie hierin mit den SEQ ID NOs. X bis Y bezeichnet werden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über verschiedene, besonders bevorzugte, für die DNA-bindenden Proteine codierenden Nukleinsäuren. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die besagten Nukleinsäuren solche sind, die mit den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren bzw. ihren Transkriptionsprodukten und/oder deren Komplementärsträngen hybridisieren, insbesondere unter stringenten Hybridisierungsbedingungen. Derartige stringente Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise solche, die in 0,1×SSC/0,1 %

SDS bei 68°C (Perfect Hyb™ Plus (Hybridisierungspuffer der Firma Sigma)) oder in 5×SSC/50 % Formamid/0,02 % SDS/2 % Blocking Reagenz/0,1 % N-Lauroylsarcosine bei 42°C über Nacht durchgeführt werden.

Weiterhin umfasst sind solche Nukleinsäuren, die eine Identität von mindestens 65, bevorzugterweise 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 oder 99 % zu den besagten Nukleinsäuren aufweisen. Unter Transkriptionsprodukt wird hierin insbesondere auch die hnRNA oder mRNA bzw. cDNA der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren bzw. der für die DNA-bindenden basischen Proteine, wie hierin beschrieben, bezeichnet.

**Tabelle 2**      Bevorzugte, für die DNA-bindenden Proteine codierenden Nukleinsäuren

SEQ ID NO.	Name der Nukleinsäure	Anzahl der Basenpaare	Exon-Struktur	Zugansnr.
31	HMGA1a mRNA			M23614
32	HMGA1a Coding Sequence	324		M23614
33	HMGA1b mRNA			M23616
34	HMGA1b Coding Sequence	291		M23616
35	HMGA2 mRNA			NM_003483
36	HMGA2 Coding Sequence	330		NM_003483
37	trunkiertes HMGA2	252	Exons 1-3 + 3 bp STOP-Codon	
38	trunkiertes HMGA2: IC113 ORF	273	Exons 1-3 + 21 Basenpaare + 3 bp STOP-Codon	U29113
39	trunkiertes HMGA2: IC117 ORF	291	Exons 1-3 + 39 Basenpaare + 3 bp STOP-Codon	U29117
40	HMGB1 mRNA			NM_002128
41	HMGB1 Coding Sequence	648		NM_002128

# BOHMANN & LOOSEN

25

42	trunkiertes HMGA2	444	Exon 1-3 + 192 bp + 3 bp STOP- Codon	U29119
43	trunkiertes HMGA2	321	Exon 1-3 + 69 bp + 3 bp STOP- Codon	U29112
44	trunkiertes HMGA2	279	Exon 1-3 + 27 bp + 3 bp STOP- Codon	H98218
45	trunkiertes HMGA2	291	Exon 1-4 + 6 bp + 3 bp STOP-Codon	U29120
46	trunkiertes HMGA2	357	Exon 1-4 + 72 bp + 3 bp STOP- Codon	U29115
47	trunkiertes HMGA2	288	Exon 1-4 + 3 bp + 3 bp STOP-Codon	U29114
48	HMGA1a AT-Hook 1	33	Codiert von Exon 5, Position 61-93 in CDS	M23614
49	HMGA1a AT-Hook 2	33	Codiert von Exon 6, Position 157- 189 in CDS	M23614
50	HMGA1a AT-Hook 3	36	Codiert von Exon 7, Position 232- 267 in CDS	M23614
51	HMGA1b AT-Hook 1	33	Codiert von Exon 5, Position 61-93 in CDS	M23616
52	HMGA1b AT-Hook 2	33	Codiert von Exon 6, Position 124- 156 in CDS	M23616
53	HMGA1b AT-Hook 3	36	Codiert von Exon 7, Position 199- 234 in CDS	M23616
54	HMGA2 AT-Hook 1	33	Codiert von Exon 1, Position 70-102 in CDS	NM_003483

55	HMGA2 AT-Hook 2	33	Codiert von Exon 2, Position 130-162 in CDS	NM_003483
56	HMGA2 AT-Hook 3	63	Codiert von Exon 3, Position 211-273 in CDS	NM_003483
57	HMGB1 HMG-BOX A (LARGE)	234	Codiert von Exon 2 + 3, Position 16-249 in CDS	U51677
58	HMGB1 HMG-BOX A (SMALL)	213	Codiert von Exon 2 + 3, Position 25-237 in CDS	P09429
59	HMGB1 HMG-BOX A (MEDIUM)	219	Codiert von Exon 2 + 3, Position 16-234 in CDS	NM_002128
60	HMGB1 HMG-BOX B (LARGE)	225	Codiert von Exon 3 - 5, Position 274-498 in CDS	U51677
61	HMGB1 HMG-BOX B (MEDIUM)	207	Codiert von Exon 3 - 5, Position 283-489 in CDS	P09429
62	HMGB1 HMG-BOX B (SMALL)	147	Codiert von Exon 3 + 4, Position 283-429 in CDS	NM_002128
63	SP100-HMGB1 mRNA	546		AF076675
64	HMGA2-LPP CDS	678	Exon 1 - 3 + 426 bp + 3 bp STOP-Codon	

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass bevorzugterweise humane basische DNA-bindende Proteine sowie die dafür codierenden Nukleinsäuren verwendet werden. Infolge der Sequenzhomologie ist es jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass es sich bei den besagten Proteinen bzw. dafür codierenden Nukleinsäuren um solche handelt, die von anderen Organismen oder Arten als dem Menschen stammen. Dabei sind insbesondere jene von anderen Säugetieren bevorzugt und hiervon wiederum ganz besonders jene von Hund, Katze, Maus, Ratte, Pferd, Rind und Schwein.

Die erfindungsgemäßen Anwendungen und Verwendungen der hierin beschriebenen basischen DNA-bindenden Proteine und der für sie codierenden Nukleinsäure, einschließlich deren Transkriptions- und/oder Translationsprodukte, erstreckt sich dabei auf eine Vielzahl von Prozessen. Bevorzugterweise sind die Prozesse jene, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese, insbesondere Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebeatmung, Vaskularisierung, insbesondere Vaskularisierung bei Herzinfarkt, Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten, Ent-Differenzierung von Zellen bzw. Geweben, Differenzierung von Zellen bzw. Geweben und Kombinationen von Ent-Differenzierung- und Differenzierungsvorgängen. Die hierin beschriebenen basischen DNA-bindenden Proteine und die für sie codierenden Nukleinsäuren weisen die Eigenschaft auf, einen oder mehrere der vorstehend genannten Prozesse zu initiieren, zu unterstützen, aufrecht zu erhalten und/oder fortzuführen. Die verschiedenen Prozesse können dabei gleichzeitig, aber auch zeitlich versetzt und gegebenenfalls überlappend unter Verwendung der besagten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren durchgeführt werden. Ohne im folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, scheint es so, dass den vorstehend genannten Prozessen gemein ist, dass die Grundlagen hierfür in einer Entdifferenzierung und/oder Reprogrammierung der betroffenen oder beteiligten Zellen begründet liegen. Grundsätzlich sind all jene Vorgänge mit den besagten Proteinen sowie der für sie codierenden Nukleinsäuren, wie hierin definiert, adressierbar im Sinne von initierbar, anregbar, unterstützbar, aufrechterhaltbar und/oder verstärkbar. Die erfindungsgemäße Anwendung und Verwendung der hierin beschriebenen basischen DNA-Proteine und der für die besagten Proteine codierenden Nukleinsäuren, wie hierin definiert, erstreckt sich dabei auch auf jene Krankheiten, die mit einem oder mehreren der hierin beschriebenen Prozesse kausal oder symptomatisch verbunden sind, bzw. für die Herstellung entsprechender Medikamente, pharmazeutischer Formulierungen oder kosmetischer Formulierungen.

Bevorzugte Erkrankungen bzw. Krankheiten, bei denen die hierin beschriebenen basischen DNA-bindenden Proteine sowie die dafür codierenden Nukleinsäuren, wie hierin definiert, verwendet werden können bzw. für deren die hierin offenbarten Medikamente oder pharmazeutischen Formulierungen verwendbar sind, sind insbesondere die folgenden: primäre und sekundäre Wundheilung, gestörte primäre und sekundäre Wundheilung, chronische Wundheilung, akute Wunden und chronische Wunden, traumatisch bedingte Wunden, komplexe trau-



matische Defekte, thermische Verletzungen, thermische Verbrennungen, chemische Verletzungen, chemische Verbrennungen, Inzisionen, OP-Wunden, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetischer Ulcus, Dekubitalulcus, chronisch posttraumatische Wunden, chronischer Lichtschaden, sowie diese Erkrankungen bei besonderen Patientengruppen, wobei die Patientengruppen insbesondere ältere Personen, Personen mit Unterernährung, Personen mit Fehlernährung, Personen mit Diabetes und/oder Personen mit Nierenerkrankungen sind.

Bei der Zell- oder Geweberegeneration ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass solche Zellen oder Gewebe regeneriert werden, die im wesentlichen auch als Ausgangsmaterial verwendet werden. Wird beispielsweise im Rahmen der Wundheilung ein defektes Hautgewebe behandelt, wird es bevorzugterweise zur Regeneration von Hautgewebe kommen, was, ohne im Folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, im wesentlichen in den vorstehend beschriebenen Wirkungen der HMG-Proteine begründet liegt. Die Geweberegeneration oder Umprogrammierung der dabei beteiligten Zellen kann durch die Gabe externer Stimulanzen gefördert werden. Derartige Stimulanzen können beispielsweise durch das Gewebe bereitgestellt werden, in das die erfindungsgemäß re- oder umprogrammierte Zelle(n) eingebracht wird/werden. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass derartige Stimulanzen, insbesondere chemische Verbindungen, die als solche wirken oder wirken können, einzeln oder in Kombination, gegebenenfalls als entsprechende Vorstufe, mit der re- oder umprogrammierten Zelle in Kontakt gebracht werden, um die Richtung, in die sich die Zelle differenzieren oder umwandeln soll, zu beeinflussen.

Der grundsätzlich gleiche Wirkmechanismus setzt auch bei der Wundheilung an. Hier spielen insbesondere der proliferationsfördernde Effekt der basischen DNA-bindenden Proteine sowie eine Beschleunigung des Wundheilungsprozesses eine große Rolle. Von besonderem Vorteil ist bei Verwendung der besagten Proteine, die Art der Narbenbildung. Bei fetaler Wundheilung erfolgt eine ausgesprochen schnelle Wundheilung ohne Narbenbildung verglichen mit der postnatalen Heilung. Mit Blick darauf, dass unter Verwendung der besagten Proteine eine aktive Wundheilung erfolgt, die den Prozess der fetalen Wundheilung widerspiegelt, tritt bei der erfindungsgemäßen Verwendung der besagten Proteine ein schneller und narbenfreier Wundverschluss auf. Ein wichtiger Aspekt bei einem jeden der Prozesse, bei denen die basischen besagten Proteine erfindungsgemäß verwendet werden, ist dabei die Tatsache, dass das Risiko für Hautirritationen sowie allergische Reaktionen als äußerst gering eingestuft werden

kann, da es sich bei den DNA-bindenden Proteine um natürliche, körpereigene Substanzen handelt. Darüber hinaus sind die besagten Proteine von Mensch und Tier durch eine hohe Konservierung nahezu identisch, so dass die Resultate aus *in vivo*-Experimenten am Versuchstier eine hohe Übertragbarkeit am Menschen aufweisen. Es ist auch im Rahmen der Wundheilung, dass unter erfindungsgemäßer Anwendung der basischen DNA-bindenden Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren die Transplantation eines Hautersatzes möglich wird, wobei es sich bei dem Hautersatz um einen solchen handelt, der ausgehend von autologen Hautzellen und ggf. deren Vermehrung erzeugt wird unter Verwendung der besagten Proteine als *in vitro*-Stimulationsfaktoren. Die hierzu erforderlichen autologen Hautzellen können beispielsweise aus Biopsien stammen. Typische Anwendungen sind dabei großflächige Verbrennungen oder Therapie-resistente chronische Ulzera. Auch hier, wie bei allen autologen Hautersatzverfahren, ist besonders vorteilhaft, dass keine Abstoßungsreaktion des Immunsystems hervorgerufen wird.

Eine vorteilhafte Anwendung der hierin beschriebenen basischen DNA-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren findet sich auch bei der Beeinflussung der Gewebeeralterung, die unter dem Einfluss der besagten Proteine verlangsamt bzw. aufgehoben wird. Eine weitere Anwendung findet sich dabei bei der Gewebeverjüngung, wobei es zwischen Verhinderung der Gewebeeralterung und Gewebeverjüngung Überlappungen hinsichtlich der zugrundeliegenden biologischen Prozesse gibt, die jedoch durch die basischen DNA-bindenden Proteine bzw. durch die dafür codierenden Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, beeinflussbar sind. Ohne im Folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, scheint dieser Effekt auf der Eigenschaft der besagten DNA-bindenden Proteine zu beruhen, die Zelle in einen Zustand zu versetzen, der dem einer jungen differenzierten bzw. fetalen Hautzelle sehr ähnlich ist. Damit werden die mit den besagten Proteinen behandelten Zellen einem Verjüngungsprozess bzw. einem Entdifferenzierungsprozess unterzogen, durch den die Zellen wieder in der Lage sind, sich zu erneuern. Vor allem die altersbedingte Verlangsamung und Verminderung der Zellerneuerung, die unter anderem durch hormonelle Veränderungen und erbliche Faktoren beeinflusst wird, kann durch die erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-bindenden Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren entgegengewirkt werden. Aber auch Schäden, die durch exogene Faktoren, wie z. B. freie Sauerstoffradikale, erzeugt werden, können durch eine durch die basischen DNA-Proteine, wie hierin beschrieben, induzierte aktive Zellregeneration vermindert, beseitigt oder in ihrer Entstehung verhindert werden. Insoweit wird mit den

erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-Proteinen bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren eine präventive und/oder kausale und nicht nur primär eine symptomatische Therapie realisiert, die faktisch bereits vorhandenen Hautschäden durch Zellerneuerung entgegenzuwirken mag. Weiterhin erfolgt bei dem Prozess der Beeinflussung der Gewebeerneuerung unter erfindungsgemäßer Verwendung der besagten Proteine eine Aktivierung der Kollagenexpression, wodurch der Abnahme bzw. dem Verlust von Kollagen und somit der Hauptursache von Falten entgegengewirkt wird.

Mit der vorstehend beschriebenen komplexen Wirkungsweise der erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren im Sinne der Gewährleistung einer ausreichenden Durchblutung des Wundbereiches erklärt sich auch deren Verwendung bei der Vaskularisierung bei Herzinfarkt. Unter dem Einfluss der erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-bindenden Proteine kommt es zur Induktion der Proliferation von Endothelzellen, die die Angiogenese im Wundbett fördern und insoweit eine Versorgung des Herzmuskels mit Blutgefäßen gewährleisten. Gleiches gilt auch für die Anwendung im Rahmen der Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten. Dabei kommen auch die proliferationsfördernde Wirkung der erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren einschließlich des Angiogenese-Effektes, wie er vorstehend beschrieben wurde, zum Tragen. Schließlich kommt insbesondere bei diesem Anwendungsaspekt die Wirkung zum Tragen, dass unter dem Einfluss der erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-bindenden Proteine die Zellen in ihrer Motilität erhöht werden, so dass ein Um- und Einwachsen von Zahn- und Knochenimplantaten besonders gefördert wird.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass anstelle der DNA-bindenden basischen Proteine auch Nukleinsäuren, wie vorstehend beschrieben, die für diese codieren, in die jeweilige Zelle bzw. in das Gewebe eingeführt werden. Die solchermaßen behandelten Nukleinsäuren sind bevorzugterweise in einen Expressionsvektor eingebracht, der die Expression der Nukleinsäure in der jeweiligen Zelle bzw. dem von dieser mit aufgebautem Gewebe erlaubt, so dass intrazellulär die entsprechenden basischen DNA-bindenden Proteine exprimiert werden. Die entsprechenden Expressionsvektoren für die jeweiligen Zellen sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt und beispielsweise beschrieben in Colosimo A. et al. (2000) Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. Review. Biotechniques 29:314-331 bzw.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Geeignete virale Vektoren zur Expression von Genen leiten sich bspw. aus inaktivierten Viren ab, wie bspw. Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Epstein-Barr-Viren, Herpes-Simplex-Viren, Papilloma-Viren, Polyoma-Viren, Retroviren, SV40 und Vaccinia-Viren. Geeignete Plasmid-Vektoren sind typischerweise aus prokaryotischen, eukaryotischen und/oder viralen Sequenzen zusammengesetzt. Beispiele hierfür sind insbesondere pTK2, pHyg, pRSVneo, pACT, pCAT, pCAT-basierte, pCI, pSI, pCR2.1, pCR2.1-basierte, pDEST, und pDEST-basierte. Den Fachleuten auf diesem Gebiet sind ebenfalls Verfahren bekannt, um die jeweilige DNA in die besagten Zellen bzw. Gewebe einzuführen, sei es dass die Einführung *in situ*, *in vivo* oder *in vitro* erfolgt. Zu den entsprechenden Verfahren gehören, unter anderem, PO<sub>4</sub>-Präzipitation (CaPO<sub>4</sub>, BES-CaPO<sub>4</sub>, SRPO<sub>4</sub>), Kationische Polymere, Liposome, Molekulare Konjugate (z. B. Polylysin), Gramicidin S-DNA-Lipid Komplexe, Elektroporation, Biolistic „gene gun“, Mikroinjektion, Rekombinante Viren und nackte DNA, wie beispielsweise beschrieben in Colosimo A. et al. (2000) Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. Review. Biotechniques 29:314-331 sowie Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) A Laboratory Manual. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Es ist somit im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die Verwendung der basischen DNA-bindenden Proteine, wie hierin beschrieben, ersetzt werden kann durch eine dafür codierende Nukleinsäure, die zur Expression der besagten basischen DNA-bindenden Proteine in einem Expressionssystem führen. Geeignete Expressionssysteme sind, u. a., Zellaufschlüsse, Zellen, Gewebe und/oder Organe.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren, insbesondere *in vitro*-Verfahren, zur Regeneration von Gewebe umfasst die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt und

c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst,

können die hierin beschriebenen DNA-bindenden basischen Proteine bzw. entsprechende Nukleinsäuren verwendet werden.

Die Bereitstellung eines Gewebes kann dabei beispielsweise durch Biopsie erfolgen. Bevorzugterweise handelt es sich bei dem bereitgestellten Gewebe um die Art von Gewebe, welches es zu regenerieren gilt. Gleichwohl ist es mit Blick auf den Wirkmechanismus der erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-Proteine nicht unbedingt erforderlich, dass eine Identität zwischen dem in diesem Schritt verwendeten, bereitgestellten Gewebe und dem tatsächlich am Ende erhaltenen Gewebe besteht. So können beispielsweise aus Fettzellen Knorpelzellen oder aus Knorpelzellen Muskelzellen unter dem Einfluss der hierin beschriebenen HMG-Gene bzw. der hierin beschriebenen Proteine bzw. Polypeptide erzeugt werden. Ohne im folgenden darauf festgelegt sein zu wollen, geht der vorliegende Erfinder davon aus, dass infolge der erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-bindenden Proteine die als Ausgangszelle(n) verwendeten Zelle(n) über einen Stammzell-ähnlichen Zustand in die jeweilige Zellart überführt wird/werden. Insoweit stellen die hierin beschriebenen Verfahren auch ein Verfahren zur Erzeugung von Quast-Stammzellen dar.

Das Inkubieren des Gewebes mit einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, wie hierin beschrieben bzw. definiert, zu dem Gewebe oder einem Teil davon kann dabei so vorgenommen werden, dass eine Aufnahme des Translationsproduktes bzw. der Nukleinsäure oder deren Transkriptionsprodukt in eine oder mehrere Zellen des Gewebes erfolgt. Bevorzugterweise wird die Nukleinsäure hierzu in einer Form bereitgestellt, die eine Transfizierung einer oder mehrerer Zellen des Gewebes erlaubt. Geeignete Maßnahmen hierzu sind beispielsweise das Zugabe der Nukleinsäure bzw. deren Transkriptionsprodukt in Form eines bzw. das Inkubieren mit Hilfe eines Liposoms oder einer anderen Form, welche die Transfektion von Zellen mit Nukleinsäuren erlaubt. Die Translationsprodukte, insbesondere die erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-bindenden Produkte können im Rahmen der Inkubation in die Zelle eingeführt werden unter

können im Rahmen der Inkubation in die Zelle eingeführt werden unter Anwendung von im Stand der Technik bekannten Verfahren, so beispielsweise durch Elektroporation, Behandlung der Zellmembran mittels eines Bakteriotoxins, wie beispielsweise Streptolysin O oder Protein-Transduktions-Domänen und Peptid-Carrier.

Die Elektroporation, bei der mit einem kurzen elektrischen Stromstoß (Puls) reversible Öffnungen (Poren) in einer Membran erzeugt werden können, wurde in den 70er Jahren erstmalig zum Einbringen von Xenomolekülen in Zellen genutzt. Durch die entstandenen Membranporen können sowohl niedermolekulare Substanzen (z. B. Farbstoffe und Peptide) als auch hochmolekulare Stoffe (z. B. Proteine, DNA und RNA) in Bakterienzellen sowie eukaryotischen Zellen eingeschleust werden. Da diese Methode jedoch im Verhältnis zu anderen Methoden eine relativ geringe Transporteffizienz aufweist, wird im Rahmen bevorzugterweise einer klinischen Anwendung bevorzugterweise auf die im Folgenden beschriebenen Methoden und Agenzien zurückzugreifen.

Membranen eukaryotischer Zellen lassen sich mittels eines Bakterientoxins, wie z. B. Streptolysin O permeabilisieren. Der Transfer von HMGA-Proteinen in eukaryotische Zellen mit Hilfe von Streptolysin O (SLO) erfolgt durch Variationen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration: in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erfolgt die Lyse der Zellen und durch die nachfolgende Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können die Zellenporen wieder verschlossen werden. Um eine Reversibilität des Lysevorganges zu gewährleisten, wird die optimale SLO-Konzentration für jeden Zelltyp im Rahmen von den Fachleuten auf dem Gebiet bekannten Routineversuchen spezifisch ermittelt. Mit Hilfe dieser Methode werden die hierin offenbarten Wirkstoffe, d. h. die basischen DNA-bindenden Proteine und die dafür codierenden Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, in beispielsweise Haut-Zellen geschleust, um z. B. das Wachstum von *in vitro* kultivierten autologen Keratinozyten zu stimulieren. Hoch proliferative Zellen können auf diese Weise Patienten mit chronischen Wunden bzw. Verbrennungspatienten als Transplantat zur Verfügung gestellt werden.

Liposomen wurden erstmals 1961 für Studien zum Ionentransport durch die Zellmembran eingesetzt und wurde später als ein nützliches Transportmittel für Medikamentenwirkstoffe entdeckt. Während jedoch die systemische Anwendung von in Liposomen eingekapselten Medikamenten bislang nur wenige Erfolge brachte, eröffnet die topische Applikation von

Liposomen in der Dermatologie neue Chancen. Darüber hinaus werden inzwischen auch Kosmetika auf Liposomenbasis in den vereinigten Staaten und Westeuropa vermarktet. Insofern stellen Liposomen besonders bevorzugte Applikationsformen für die Verabreichung der basischen DNA-bindenden Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren dar, insbesondere im Falle der hierin beschriebenen Herstellung von Medikamenten und kosmetischen Produkten.

Liposomen sind Mycellen, die in ihrem Aufbau der Doppellipidschicht der Zellmembran gleichen und somit, wenn man sie im Überschuss zugibt, mit den Zellen verschmelzen. Vorher in die hydrophile Phase der Liposomen eingebrachte bzw. verkapselte Wirkstoffe können daher in der Zelle freigegeben werden. Die Klassifikation von Liposomen basiert auf ihrer Größe und auf der Anzahl der Lipiddoppelschichten. Es gibt große Vesikel (von 0,1 bis  $>10\ \mu\text{m}$ ) mit mehreren Lipiddoppelschichten (multilamellar large vesicles = MLV), große Vesikel ( $\geq 0,06\ \mu\text{m}$ ) mit einer Lipiddoppelschicht (large unilamellar vesicles) und kleine Vesikel ( $0,02 - 0,05\ \mu\text{m}$ ) mit einer Lipiddoppelschicht (small unilamellar vesicles). Über die Anzahl der Lipiddoppellayer kann bis zu einem gewissen Grad die quantitative Freilassung des Wirkstoffes in der Zelle gesteuert werden. Desweiteren kann über den Einbau von z. B. Ceramiden anstelle der Phospholipidkomponenten, d. h. Strukturen die denen der Membranstrukturen von Keratinozyten ähneln, die Kompatibilität zwischen Liposomen und der Haut erhöht werden. Diese Methode eignet sich daher besonders für ein topisch zu applizierendes Präparat mit einem Wirkstoff auf der Basis der hierin beschriebenen basischen DNA-bindenden Proteine und der dafür codierenden Nukleinsäuren. Aufgrund der geringen Größe der HMGA-Proteine ( $<12\ \text{kDa}$ ) eignen sich diese darüber hinaus besonders gut für eine Verpackung in Liposomen.

Protein Transduktions Domänen (PTD) und Peptid-Carrier stellen eine effiziente Möglichkeit dar, um die erfindungsgemäß verwendeten Proteine in Zellen zu schleusen. PTDs sind im Allgemeinen kurze Peptide von 10 - 16 Aminosäuren (meist positiv geladene Lysin und Argininreste), die kovalent mit dem zu transportierenden Protein verbunden sind. Die PTD-vermittelte Transduktion erfolgt über einen bislang wenig bekannten Mechanismus, der unabhängig von Rezeptoren, Transportern und der Endocytose ist. Mit Hilfe der PTDs konnten bereits Proteine mit einer Größe von bis zu 700 kDa in Zellen geschleust werden. Desweiteren sind die PTDs insbesondere für den Transport von Medikamentenwirkstoffen wie den erfindungsgemäß verwendeten basischen DNA-bindenden Proteinen und den sie codierenden

Nukleinsäuren, wie hierin beschrieben, geeignet, da bereits die *in vivo*-Transduktion von Proteinen in Geweben und Zellen nachgewiesen werden konnte. Durch die kovalente Bindung der PTDs an die zu übertragenden Proteine ist diese Technologie jedoch hinsichtlich einer vollständig zu erhaltenden Funktionalität des zu transportierenden Wirkstoffes bedingt limitiert. Bevorzugterweise wird auch deshalb in bevorzugten Ausführungsformen auf nicht-kovalente Peptid-Carrier zurückgegriffen, wie z. B. dem Chariot Reagenz (Carlsbad). Dieses Protein Transport System beruht auf einem kurzen synthetischen Signalpeptid (Pep-1), das sich mit dem zu transportierenden Protein über nichtkovalente hydrophobe Interaktionen komplexiert. Innerhalb der Zelle dissoziiert das transportierte Protein von dem Pep1-Peptid und wird durch zelluläre Transportmechanismen weiter zu der vorhergesehenen intrazellulären Lokalisation transportiert werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die hohe Effizienz des Transportes von – je nach Zelltyp und Protein – 60 - 95 %. Diese Methode eignet sich damit sowohl für den Einsatz im Rahmen der durch die basischen DNA-bindenden Proteine vermittelten Proliferationsförderung bei *in vitro* kultivierten autologen Haut-Zellen als auch im Rahmen eines topisch zu applizierenden entsprechenden Präparates mit einem oder mehreren der hierin beschriebenen Wirkstoffen.

Die Inkubation des Gewebes mit der Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt erfolgt dabei unter Bedingungen, die eine Aufnahme derselben in die Zelle bzw. das Gewebe erlaubt. Bevorzugterweise erfolgt die Inkubation bei 37°C unter physiologischen Bedingungen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, insbesondere ein *in vitro*-Verfahren, zur Differenzierung, Entdifferenzierung und/oder Reprogrammierung von Zellen umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen einer oder mehrerer Zellen,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, und
- c) Inkubieren der Zelle und der Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt



und/oder deren Translationsprodukt wie im Zusammenhang mit den anderen Aspekten oben ausgeführt ausgewählt sein kann/können.

Auch hier gilt hinsichtlich der Durchführung der einzelnen Schritte das im Zusammenhang mit dem hierin beschriebenen Verfahren zur Regeneration von Gewebe Gesagte sinngemäß. Obwohl nicht darauf beschränkt kann die bereitgestellte Zelle grundsätzlich eine jede, insbesondere mesenchymale Zelle wie beispielsweise eine Fettzelle, Knorpelzelle oder Muskelzelle sein.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Formulierung, welche eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt, wie hierin beschrieben und einen pharmazeutisch geeigneten Träger umfasst. Eine pharmazeutische Formulierung kann dabei eine solche sein, die für die verschiedenen Formen der Applikation ausgebildet ist. Derartige Applikationsformen schließen insbesondere die topische Applikation und die subkutane Applikation ein. Gleiches gilt für die kosmetische Formulierung gemäß der vorliegenden Erfindung. Als geeignete pharmazeutische oder kosmetische Träger können die folgenden einzelnen oder in beliebiger Kombination verwendet werden: Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika, Alkohole, Basen, Säuren, Stärke, Feuchthaltemittel, Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogege, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Zellen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind sowie Gewebe, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind.

In einem weiteren Aspekt betrifft die Erfindung Trägermaterial, welches eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt umfasst, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukte und/oder deren Translationsprodukte solche, wie sie hierin beschrieben sind, darstellen können. Das Trägermaterial wird insbesondere als Implantat oder als Abdeckmaterial, bevorzugt zur Wundheilung aber auch für eine jegliche andere der hierin beschriebenen Erkrankungen oder Zustände, verwendet. Grundsätzlich sind jegliche

Materialien hierzu verwendbar, die für Implantatmaterialien oder als Abdeckmittel bzw. Trägermaterial für die Wundheilung, wie sie im Stand der Technik bekannt sind, bereits verwendet werden einschließlich, aber nicht darauf beschränkt Hydrokolloide, Hydrogele, Hydropolymere, Schaumverbände, Kalziumalginate, Aktivkohle, Schaumstoff, Folien, Silikonschaum, Fleecestoffe, Kunstseide, Baumwollgase, Kautschuk, Paraffin und Paraffingase. Geeignete Kunststoffe sind dabei Polyethylene, Polyvinylene, Polyamide und Polyurethane. Die erfindungsgemäß verwendeten Nukleinsäuren und basischen DNA-bindende Proteine sind bevorzugterweise an dem Trägermaterial in nicht-kovalenter Art und Weise absorbiert. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass diese kovalent gebunden sind und/oder unter den jeweiligen Anwendungsbedingungen eine Freisetzung derselben von dem eigentlichen Trägermaterial erfolgt. Geeignete Anwendungsmöglichkeiten sind dem Fachmann auf dem Gebiet bekannt. Eine besondere Form des Trägermaterials ist das Wundabdeckmaterial, welches aus einem Basisdeckmaterial und einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt besteht, wobei diese wie hierin beschrieben ausgestaltet sind. In diesem Falle kann das Basisdeckmaterial ein Trägermaterial im hierin beschriebenen Sinne darstellen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Screenen einer Verbindung, wobei die Verbindung der Förderung und/oder der Inhibierung eines Prozesses dient. Der Prozess kann dabei ein jeder der Prozesse, einzeln oder in beliebigen Kombinationen, sein, wie sie hierin beschrieben sind, insbesondere kann der Prozess ausgewählt sein aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Veränderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst. Weiterhin kann der Prozess ganz allgemein ein solcher sein, welcher die Umprogrammierung, Umdifferenzierung oder Entdifferenzierung, gegebenenfalls mit anschließender erneuter Differenzierung, umfasst. Ohne im Folgenden hierauf festgelegt sein zu wollen, ist es den Prozessen, wie sie hierin beschrieben sind, scheinbar zu eigen, dass diese mit dem Übergang zumindest einer Zelle in einen Quasi-Stammzell-Charakter verbunden sind, auf der Grundlage dessen bzw. ausgehend von welchem eine erneute Differenzierung der Zelle erfolgt.

Im einfachsten Falle sieht das erfindungsgemäße Verfahren zum Screenen einer Verbindung vor, dass die folgenden Schritte realisiert werden:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem System verursachten Reaktion.

Bei einem Testsystem handelt es sich bevorzugterweise um ein solches, welches erlaubt, den jeweiligen Prozess darzustellen, insbesondere darzustellen unter dem Einfluss einer Verbindung, von der vermutet wird, dass sie den Prozess entweder fördert oder inhibiert, einer sogenannten Kandidaten-Verbindung, und/oder unter dem Einfluss einer Referenz-Verbindung. Derartige Systeme sind den Fachleuten auf dem Gebiet bekannt. Bevorzugterweise umfasst ein derartiges Testsystem eine oder mehrere Zellen, gegebenenfalls ein Gewebe oder Gewebe, die die besagte(n) Zelle(n) enthalten, wobei das Verhalten der Zellen bzw. des Gewebes untersucht wird. Das Verhalten ist dabei insbesondere Wachstum der Zellen bzw. des Gewebes, Differenzierung, und die verschiedenen Facetten oder Aspekte davon, wie insbesondere Entdifferenzierung und – erneute – Differenzierung. Neben dem direkten Wachstum können dabei auch andere Phänomene oder Parameter verwendet werden, um eine Reaktion des Testsystems zu beschreiben. Derartige Parameter können beispielsweise biochemische, genetische, molekulargenetische, molekularbiologische, histologische, zytologische, physiologische und phänotypische Parameter sein. Biochemische Parameter können beispielsweise Stoffwechselwege, typische Edukte ebenso wie Produkte davon sein, die mit den besagten Prozessen direkt oder indirekt verbunden sind. Genetische und molekulargenetische Parameter sind dabei solche, die auf der Ebene der Nukleinsäure, sowohl genomische Nukleinsäure als auch hnRNA, mRNA und dergleichen, mit den besagten Prozessen verbunden sind. Dabei kann es im Rahmen der vorliegenden Erfindung sein, dass als genetischer Parameter das Auftreten einer entsprechenden Nukleinsäure gemessen wird, das Verschwinden einer entsprechenden Nukleinsäure, oder deren quantitative Veränderung bei der Förderung bzw. Inhibierung der besagten Prozesse. Mit molekularbiologischen Parametern können u.a. Proteine über deren Auftreten und Verschwinden mit den besagten Prozessen verbunden sein. Physiologische Parameter können dabei das Verhalten,

parameter können dabei das Verhalten, insbesondere das Ansprechverhalten, der Zellen bzw. des Gewebes sein auf Reize, wie beispielsweise biologische, chemische oder physikalische Reize, die von dem jeweiligen Testsystem, d. h. den Zellen bzw. dem Gewebe in Abhängigkeit von dem Prozess bzw. dessen Förderung oder Inhibierung unterschiedlich beantwortet werden.

In einer Ausführungsform ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung derartiger Prozesse vorgesehen, dass neben einem entsprechenden Testsystem für den Prozess eine Referenz-Verbindung bereitgestellt wird und die Referenz-Verbindung mit dem Testsystem in Kontakt gebracht wird, d. h. die Referenz-Verbindung im Testsystem getestet wird. Dieses Kontaktieren erfolgt bevorzugterweise dadurch, dass die Referenz-Verbindung, bevorzugterweise in Form einer Lösung, bevorzugterweise in Lösung in einem Puffer vorliegend, mit dem Testsystem in Verbindung gebracht wird, bevorzugterweise dem Kulturmedium hinzugesetzt wird. Es ist auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass das Inkontaktbringen der Referenz-Verbindung mit dem Testsystem ortsspezifisch erfolgt, beispielsweise die Referenz-Verbindung in bestimmte Zellen des Gewebes oder aber auch in bestimmte Kompartimente der Zelle(n) eingebracht wird. Die Zell-spezifische ebenso wie die Kompartiment-spezifische Verabreichung derartiger Referenz-Verbindungen sind den Fachleuten auf dem Gebiet grundsätzlich bekannt. Es können z.B. Referenz-Verbindungen über Mikroinjektion, in definierte Bereiche bzw. Kompartimente der Zelle injiziert werden wie beispielsweise beschrieben in Wang B et al (2001) Expression of a reporter gene after microinjection of mammalian artificial chromosomes into pronuclei of bovine zygotes. *Mol Reprod Dev* 60:433-8. Zudem stehen Verfahren zur Verfügung, Referenz-Verbindungen z.B. über Aminosäuretransporter zu behandeln oder zu modifizieren, so dass die Referenz-Verbindungen spezifische Zellen, wie z.B. Fibroblasten wie beispielsweise beschrieben in Palacin M et al. (1998) Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 78:969-1054, oder spezifische Zellkompartimente, wie z.B. den Nukleus, wie beispielsweise beschrieben in Chaloin L et al. (1998) Design of carrier peptide-oligonucleotide conjugates with rapid membrane translocation and nuclear localization properties. *Biochem Biophys Res Commun* 243:601-608, oder die Mitochondrien, wie beispielsweise beschrieben in Pain D et al. (1991) Machinery for protein import into chloroplasts and mitochondria. *Genet Eng (N Y)* 13:153-166., erreichen. Die Zell-

spezifische oder die Kompartiment-spezifische Verabreichung kann auch für die Kandidaten-Verbindung, wie hierin beschrieben, erfolgen.

In einem nächsten Schritt erfolgt eine Bestimmung der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion. Dabei können wiederum bevorzugterweise die vorstehend genannten Parameter verwendet werden, um den Einfluss der Referenz-Verbindung im Testsystem zu bestimmen. In einem weiteren Schritt dieser Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse wird sodann die Kandidaten-Verbindung bereitgestellt und diese, ähnlich wie die Referenz-Verbindung, in dem Testsystem getestet. Anschließend erfolgt die Bestimmung der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion, wobei grundsätzlich die im Zusammenhang mit der Referenz-Verbindung besprochenen Parameter herangezogen werden können. Schließlich wird die Reaktion des Testsystems, ausgedrückt durch die vorstehend genannten Parameter, unter dem Einfluss der Referenz-Verbindung mit dem Verhalten des Testsystems unter dem Einfluss der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verglichen. Dabei wird eine Kandidaten-Verbindung als eine Verbindung zur Förderung eines oder mehrerer der besagten Prozesse bezeichnet, wenn der jeweilige Prozess unter dem Einfluss der Kandidaten-Verbindung die gleiche Reaktion oder eine stärkere Reaktion in dem Testsystem hervorruft als die Referenz-Verbindung. Umgekehrt ist eine Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Inhibierung eines oder mehrerer der besagten Prozesse, wenn die Kandidaten-Verbindung im Testsystem eine Reaktion hervorruft, die geringer ist als die entsprechende Reaktion der Referenz-Verbindung. Dabei ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass ein und dieselbe Kandidaten-Verbindung durchaus unterschiedliche Wirkungen im Sinne von Inhibierung bzw. Förderung für einen Prozess gegenüber einem anderen der vorstehend genannten Prozesse zeigt. Weiterhin ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass die zeitliche Abfolge des Testens der Referenz-Verbindung und der Kandidaten-Verbindung auch umgekehrt werden kann.

In einem weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse wird wiederum ein Testsystem für den Prozess bereitgestellt und anschließend eine Referenz-Verbindung. In dieser Ausführungsform ist die Referenz-Verbindung sodann mit einer Markierung versehen. Grundsätzlich sind jegliche Markierungen geeignet, insbesondere solche, welche eine radio-

aktive, fluoreszierende, immunologische, Enzym- oder Affinitäts-Markierung umfasst bzw. eine solche erlaubt. Radioaktive Markierungen sind dabei insbesondere  $^1\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{51}\text{Cr}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{14}\text{C}$ , Fluoreszenzmarkierungen umfassen dabei Markierungen mit Fluorescein, Fluorescamin, Isocyanat, Luciferase, Rhodamin, Texas Red, Cy3 und Cy5. Zu den immunologischen Markierungen gehören neben diversen Immunogenen u.a. die Immunglobuline IgM, IgA, IgD, IgE und IgG, inklusive, aber nicht darauf beschränkt, IgG1, IgG2a und IgG2b. Enzym-Markierungen umfassen insbesondere die Alkalische Phosphatase und die Peroxidase. Zu den Affinitätsmarkierungen gehören GST- und His-Tag-Markierungen sowie Markierungen über Biotin und Digoxigenin. Bevorzugterweise wird die Markierung eine solche sein, welche die Reaktion, die die Referenz-Verbindung im Testsystem verursacht, nicht nachteilig beeinflusst. Eine solchermaßen markierte Referenz-Verbindung wird sodann, wie vorstehend beschrieben, im Testsystem getestet und die von ihr verursachte Reaktion im Testsystem bestimmt. In einem weiteren Schritt wird sodann eine Kandidaten-Verbindung bereitgestellt und auch diese im Testsystem wie vorstehend geschildert getestet, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung während des Testens der durch die Kandidaten-Verbindung verursachten Reaktion enthält. Dabei ist bevorzugt, dass das Testen unter Bedingungen erfolgt, die gewährleisten, dass die Referenz-Verbindung nach wie vor biologisch aktiv ist, d. h. die fördernde bzw. inhibierende Wirkung zeigt. Nach Zugabe der Kandidaten-Verbindung wird die Reaktion des Testsystems wiederum bestimmt, wobei es grundsätzlich möglich ist, dass die vorstehend beschriebenen biochemischen Parameter herangezogen werden. Bevorzugterweise wird in Ergänzung dazu oder alternativ dazu die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung mittels der entsprechenden Markierung oder aber die freigesetzte Markierung als solches bestimmt.

In einem noch weiteren Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse ist vorgesehen, dass eine Markierung der Kandidaten-Verbindung erfolgt. In einer Ausführungsform ist dabei vorgesehen, dass die Kandidaten-Verbindung bereitgestellt wird und anschließend das Testsystem getestet wird und die von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion bestimmt wird mit anschließender Bereitstellung einer Referenz-Verbindung, gefolgt vom Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, insbesondere unter Bedingungen, die gewährleisten, dass die Referenz-Verbindung physiologisch aktiv ist, und die Reaktion des Testsystems bestimmt, wobei

insbesondere die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird. Alternativ, aber auch in Ergänzung dazu, können die besagten Parameter bestimmt werden, wie vorstehend beschrieben, um die Reaktion sowohl der Referenz-Verbindung als auch der Kandidaten-Verbindung auf den jeweiligen Prozess zu charakterisieren. Es ist dabei auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, wenn die Reihenfolge der Zugabe von Kandidaten-Verbindung und Referenz-Verbindung, unabhängig davon, welche der Verbindungen mit einer Markierung versehen ist, umgekehrt wird. Im ersten der beiden vorstehend beschriebenen Verfahrensweisen verdrängt die Referenz-Verbindung die Kandidaten-Verbindung, im zweiten Falle verdrängt die Kandidaten-Verbindung die Referenz-Verbindung. Schließlich ist es im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass bei den verschiedenen Aspekten der erfindungsgemäßen Screening-Verfahren, bei denen eine Markierung entweder der Kandidaten-Verbindung oder der Referenz-Verbindung vorliegt, hierin auch als erste Markierung bezeichnet, auch die jeweils andere Verbindung eine Markierung trägt, im folgenden auch als zweite Markierung bezeichnet, wobei die erste und die zweite Markierung bevorzugterweise voneinander verschieden sind.

Im Rahmen einer jeglichen der erfindungsgemäßen Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines der besagten Prozesse ist dabei vorgesehen, dass die Referenz-Verbindung eine Nukleinsäure, oder deren Transkriptionsprodukt oder deren Translationsprodukt, gegebenenfalls eine Kombination derselben, ist, wobei die Nukleinsäure eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst. Besonders bevorzugte DNA-bindende Proteine sind dabei jene, wie sie hierin beschrieben sind, insbesondere jene gemäß SEQ ID NO. 1 bis SEQ ID NO. 30 bzw. die für Proteine codierenden Nukleinsäuren gemäß SEQ ID No. 31 bis 64 und jene, wie sie in den Tabellen 1 bzw. 2 dargestellt sind.

Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass im Rahmen der verschiedenen Anwendungen bzw. Verwendungen ein einzelnes der hierin beschriebenen DNA-bindenden Proteine und/oder eine einzelne dafür oder für eines der hierin beschriebenen basischen DNA-bindenden Proteine verwendet wird. Es ist jedoch auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung, dass eine Mischung aus zwei oder mehreren der besagten Proteine bzw. der für sie codierenden Nukleinsäuren verwendet werden. Es ist weiterhin im Rahmen der vorliegenden

Erfindung, dass die Begriffe Protein und Peptid bzw. Polypeptid hierin synonym verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand der Figuren, Beispiele sowie des Sequenzprotokolls erläutert, aus denen sich weitere Merkmale, Ausgestaltungsformen und Vorteile ergeben. Dabei zeigt

Fig. 1 eine Erhöhung der Anzahl mitotisch aktiver Hautzellen unter dem Einfluss von HMGA1a;

Fig. 2 eine Immunfluoreszenzaufnahme von Hela-Zellen, die zum Teil fluoreszenzmarkiertes HMGA1b-Protein in den Zellkernen aufweisen;

Fig. 3 eine Immunfluoreszenzaufnahme von Fibroblasten, die zum Teil fluoreszenzmarkiertes HMGA1b-Protein in den Zellkernen aufweisen;

Fig. 4 eine Fluoreszenzaufnahme von Zellen, die reines Fluoreszein aufgenommen haben als Negativkontrolle zu den in Fig. 2 und 3 dargestellten Aufnahmen;

Fig. 5 eine lichtmikroskopische Aufnahme eines mit HMGA-Protein behandelten Hautstückchens, aus dem verschiedene Hautzelltypen wie Keratinocyten und Fibroblasten ausgewachsen; und

Fig. 6 eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Gefrierschnittes durch die Haut der Ratte zum Beleg des Transfers von markiertem HMGA1b-Protein nach Streptolysin O-Behandlung.

## **Beispiel 1: Material und Methoden**

Die folgenden Materialien und Methoden wurden im Rahmen der weiteren Beispiele verwendet, sofern nicht im Einzelfall davon abweichend angegeben.



Der Transfer von Proteinen in eukaryotische Zellen mit Hilfe von Streptolysin O (SLO) erfolgt durch Variationen in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration: in Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erfolgt die Lyse der Zellen und durch nachfolgende Zugabe von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen können die Zellen wieder verschlossen werden.

## Kultivierung der Zellen

Als Vorbereitung werden die Zellen, insbesondere die Fibroblasten gleichmäßig auf 6-Well Platten mit je 2,5 ml Medium 199 (Gibco-BRL; mit 5 % fetalem Kälberserum) pro Well verteilt und über Nacht bis zu einer Zelldichte von ca. 50 - 70 % bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  Begasung inkubiert. Als alternative Variation zum intakten Monolayer wird bei einigen Testreihen vor Versuchsbeginn in der Mitte der Wells mittels eines Zellscharbers ein zellfreier Raum erzeugt, um eine künstliche Wunde zu simulieren.

## Verfahren zum Einschleusen von HMGA1a in Monolayerzellkulturen mittels Streptolysin O

Vor der Lyse werden die Zellen zweimal mit 1×PBS gewaschen, um Mediumrückstände, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen enthalten, zu entfernen. Die Lyse der Zellen durch Streptolysin O (Streptolysin O Reagent, Sigma-RBI) erfolgt in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem PBS-Puffer (Biochrom). Als optimale Streptolysin-Konzentration, bei der die Mehrzahl der Zellen reversibel verschließbare Poren erhalten, konnte in Vorversuchen mittels Trypan-Blau Färbung (Sigma-RBI) eine Konzentration von 0,1 U SLO/1 ml PBS für Fibroblasten der menschlichen Haut ermittelt werden. Pro Well werden 1 ml des PBS/Streptolysin-Gemisches mit der gewünschten Konzentration des auszutestenden HMG-Proteins (z. B. 100 ng/ml, 200 ng/ml und 1000 ng/ml HMGA1a) auf die Fibroblasten gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT erfolgt die Zugabe von 3 ml eiskaltem Medium 199 (mit 5 % fetalem Kälberserum und 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ), um die Zellen wieder zu verschließen. Die Zellen werden für 2 Stunden bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  Begasung inkubiert. Anschließend werden die verschiedenen Ansätze durch 2,5 ml frisches Medium ersetzt und weiterhin bis zur Auswertung wie zuvor inkubiert.

Zur Auswertung werden die Zellen mikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie und der Besiedelung des zellfreien Raums beurteilt. Desweiteren erfolgt eine Methanol-Fixierung der

Zellen mit anschließender Giemsaefärbung (2 %ige Giemsalösung), um die Anzahl der Mitosen gegenüber der Gesamtzellzahl zu bestimmen.

Verfahren zum Einschleusen von fluoreszenzmarkiertem HMGA1b in Monolayerzellkulturen mittels Streptolysin O

Vorbereitend wurden Helazellen und Fibroblasten in Leighton-Tubes mit je 1 ml Medium 199 o/n bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Helazellen wurden in Medium mit 20 % fetalem Kälberserum, die Fibroblasten mit 5 %igem Kälberserum kultiviert.

Um sicherzustellen, daß keine Mediumreste mehr vorhanden sind, werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Das bei RT aufgetaute Streptolysin O wurde mit PBS auf eine Konzentration von 0,1 U/ml verdünnt. Anschließend wurden 350 µl des verdünnten Streptolysins O und 6 µg markiertes HMGA1b-Protein bzw. als Negativkontrolle 6 µg FLUOS-Lösung zu den Hela-Zellen und den Fibroblasten gegeben. Der Ansatz wurde 15 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem Medium 199 (mit 20 % fetalem Kälberserum für die Hela-Zellen und 5 %igem Kälberserum für die Fibroblasten) wurden die Zellen wieder verschlossen. Nach einer Inkubation von 1 h 30 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> werden die Deckgläschen in PBS kurz gewaschen und danach auf OT eingedeckt. Die Auswertung erfolgte nach ca. 2 h.

Verfahren zum Einschleusen von HMGA-Proteinen in Gewebestücke der Haut

Die Hautproben werden steril entnommen und für den Transport und bis zum Versuchsbeginn in Hanks-Lösung (Biochrom) gelagert. Für den Versuch wird die Haut in ca. 0,5 - 1 mm große Stücke geschnitten und auf Sarstedtröhrchen verteilt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 120×g und RT werden die Hautstücke dreimal in 1×PBS gewaschen, bis alle Mediumreste ausgewaschen sind. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird der Überstand vollständig entfernt und die Hautstückchen für 15 min bei RT in 1 ml SLO/PBS-Lösung (0,1 U SLO/1 ml PBS) und 1000 ng/ml des jeweiligen HMG-Proteins (HMGA1a, HMGA1b, HMGA2) pro Ansatz inkubiert. Zum Beenden der Lyse erfolgt die Zugabe von je 3 ml eiskaltem Medium 199 (mit 20 % fetalem Kälberserum und 1,8 mM Ca<sup>2+</sup>) und eine Inkubation der Ansätze

für 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung. Abschließend werden die Hautstückchen auf sterile Deckgläschen verteilt, invertiert in Feuchtkammern überführt, mit je 5 ml 20 %igem Medium 199 bedeckt und weiterhin bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> Begasung inkubiert. Zur Auswertung werden die Hautstückchen täglich mikroskopiert und das Auswachsen der verschiedenen Hautzelltypen dokumentiert.

#### Verfahren zum Einschleusen von fluoreszenzmarkiertem HMGA1b in Gewebestücke der Haut

Die frisch entnommene Rattenhaut wurde in Medium 199 mit 20 %igem fetalem Kälberserum mittels sterilem Präparierbesteck in kleine Stücke, die einer Größe von ca. 1 - 2 mm<sup>2</sup> entsprachen, klein geschnitten. Die Hautstückchen wurden viermal mit PBS gewaschen, um so sämtliche Medium bzw. Ca<sup>2+</sup>-Rückstände zu beseitigen. Anschließend wurden die Hautstückchen in ein Eppendorfcup überführt und 350 µl des verdünnten Streptolysins O (0,1 U/ml) und 6 µg markiertes HMGA1b-Protein bzw. als Negativkontrolle 6 µg FLUOS-Lösung zu den Hautstücken gegeben. Der Ansatz wurde 15 min lichtgeschützt bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von 1 ml eiskaltem Medium 199 (mit 20 % fetalem Kälberserum) wurden die Zellen wieder verschlossen. Nach einer Inkubation von 1 h 30 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> werden von den Hautstücken Gefrierschnitte angefertigt, die mit Antifade eingedeckt wurden.

Die Auswertung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop erfolgte nach ca. 2 - 3 h.

#### Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung von HMG-Proteinen

Die Markierung erfolgte nach dem Fluorescein Labeling Kit der Firma Roche.

Es wurden pro Ansatz 100 µg HMG-Protein, insbesondere HMGA1b Protein lyophilisiert und in 100 µl PBS-Puffer resuspendiert. Zu dem gelösten HMGA1b wurden 1 µl FLUOS-Lösung (2 mg/ml) gegeben und der Ansatz wurde lichtgeschützt, unter Rühren 2 h bei RT inkubiert.

Sephadex-G-25-Säulen wurden mit 5 ml Blockierungslösung und 30 ml PBS äquilibriert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf die Säule übertragen und das markierte Protein mit

3,5 ml PBS eluiert. Das markierte Protein war jeweils in den ersten beiden Pools von jeweils 10 Tropfen (ca. 0,5 ml) enthalten.

Eine Verifizierung der Markierung erfolgte mittels HPLC (Vergleich der Peaks von FLUOS-Lösung/markiertes HMGA1b) und PA-Gel. Dabei zeigte das markierte Protein bei UV-Licht eine deutliche Bande, was mittels Coomassie-Färbung bestätigt werden konnte. Es wurden ca. 60 µg/ml HMGA1b mit Fluorescein markiert.

**Beispiel 2: Transfer von HMGA1a-Proteinen in Fibroblasten-Monolayerkulturen der humanen Haut durch Streptolysin O**

Im Vergleich zu den Hautzellen der Negativkontrolle (Behandlung nur mit Streptolysin O) konnte bei den mit den HMGA1a-Proteinen behandelten Zellen eine signifikante Erhöhung der Proliferationsrate festgestellt werden. Entsprechend der erhöhten Proliferationsrate konnte auch bei Auszählung der Anzahl der Zellen, die sich in der Mitose befinden, im Verhältnis zu der Gesamtzellzahl ein signifikanter Anstieg in der Zellteilungsrate ermittelt werden. wie dies auch in Fig. 1 dargestellt ist. Darüber hinaus wiesen die mit HMGA-Proteinen behandelten Zellen eine erhöhte Motilität auf, was z. B. anhand des Einwuchses der Zellen in den zellfreien Raum ermittelt werden konnte.

**Beispiel 3: Transfer von markierten HMGA1b-Proteinen in mit SLO behandelte Zellen**

Die Aufnahme der markierten HMGA1b Proteine konnte nach einer Inkubationszeit von ca. 2 h sowohl in den Kernen der Hela-Zellen (Fig. 2) als auch in denen von Fibroblasten (Fig. 3) gezeigt werden. Die Betrachtung der Zellen unmittelbar nach der Behandlung mit SLO zeigte keine Positivität der Zellkerne, d. h. die Aufnahme der HMGA1b-Proteine in den Zellkern dauert ca. 2 h. Es wurde beispielhaft für die Helazellen ein Verhältnis von HMGA1b-positiven Zellkernen im Vergleich zu HMGA1b-negativen von 16 zu 32 ermittelt.

Der Vergleich zur Negativkontrolle, d. h. die Aufnahme des reinen Fluoresceins, ergab keine Kernpositivität, sondern nur eine grünliche diffuse Färbung des Cytoplasmas, wie dies auch in Fig. 4 dargestellt ist.

**Beispiel 4: Transfer von HMGA-Proteinen in Hautproben von Mensch und Ratte durch Streptolysin O**

Bei dem Transfer der HMGA-Proteine (HMGA1a, HMGA1b und HMGA2) in die Zellen von Hautproben von Mensch und Ratte konnte eine erhöhte Proliferation bei den mit HMGA-Proteinen behandelten Hautstücken im Vergleich zu den Negativkontrollen ermittelt werden. Aus den analysierten Hautproben wuchsen verschiedene Hautzelltypen (z. B. Keratinozyten, Fibroblasten) aus (siehe Fig. 5), die trotz der Streptolysinbehandlung eine hohe Zellteilungsrate und Zellvitalität aufwiesen. Darüber hinaus war bei den mit HMGA-Proteinen behandelten Hautproben neben der erhöhten Proliferationsrate auch ein deutlicher Anstieg in der Motilität der Zellen zu verzeichnen; was die Übertragbarkeit des hierin offenbarten therapeutischen Konzeptes von Zellkulturen auf Gewebe bestätigt.

**Beispiel 5: Transfer von markierten HMGA1b-Proteinen in die Haut der Ratte durch Streptolysin O**

Die Auswertung der Gefrierschnitte ergab, wie Fig. 6 gezeigt, eine starke Kernpositivität bezüglich HMGA1 sowohl des Plattenepithels als auch teilweise des Bindegewebes. Auch hier zeigte sich, wie zuvor in der Zellkultur beobachtet, daß eine Kernpositivität erst nach einer Inkubationszeit von ca. 2 h beobachtet werden kann. Dies bestätigt wiederum, daß der Kerntransport der HMG-Proteine ca. 2 h beträgt.

Ein Vergleich zur Negativkontrolle zeigte eine grünliche diffuse Färbung des Cytoplasmas, wobei alle Zellkerne negativ gefärbt waren.

**Beispiel 6: Fluoresceinmarkierung des HMGA1b-Proteins**

Eine Verifizierung der Markierung erfolgte mittels HPLC (Vergleich der Peaks von FLUOS-Lösung/markiertes HMGA1b) und PA-Gel. Dabei zeigte das markierte Protein bei UV-Licht eine deutliche Bande, welches mittels Coomassie-Färbung bestätigt werden konnte. Es wurden ca. 60 µg/ml HMGA1b mit Fluorescein markiert.

**Beispiel 7: Expressionsprofilanalyse mittels Mikroarrays**

Zur Analyse der molekulargenetischen Wirkungsweise der HMGA1b-Proteine bei der Geweberegeneration wurden Mikroarrays (Human 30K Array (A/B/C) von MWG-Biotech) eingesetzt, um das Expressionsmuster der mit HMGA1b-Proteinen behandelten Hautproben im Vergleich zu unbehandelten Hautproben zu analysieren.

Hierzu wurde eine humane Hautprobe in ca. 0,5 - 1 mm große Stücke geschnitten und auf Sarstedtröhrchen verteilt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 120×g und RT wurden die Hautstücke dreimal in 1×PBS gewaschen, bis alle Mediumreste ausgewaschen waren. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vollständig entfernt und die Hautstückchen für 15 min bei RT in 1 ml SLO/PBS-Lösung (0,1 U SLO/1 ml PBS) und 1000 ng/ml des HMGA1b-Proteins pro Ansatz bzw. ohne Protein (Negativkontrolle) inkubiert. Zum Beenden der Lyse erfolgte die Zugabe von je 3 ml eiskaltem Medium 199 (mit 20 % fetalem Kälberserum und 1,8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) und eine Inkubation der Ansätze für 12 Stunden bei 37°C und 5 %  $\text{CO}_2$  Begasung.

Die Isolierung der RNA aus den Hautproben erfolgte über das RNeasy RNA Isolierungs Kit (Qiagen) nach dem Protokoll „Isolation of total RNA from Heart, Muscle, and Skin Tissue“ des Herstellers und einem zusätzlichen DNase Verdau für 2×15 min bei 25°C. Die Synthese der ss cDNA wurde nach dem Standardprotokoll für Superscript (Invitrogen) durchgeführt. Die Fluoreszenzmarkierung der cDNA erfolgte mit Cy3-UTP und Cy5-UTP über „Direct-labeling“ der ss cDNA.

Zur Hybridisierung wurde die markierte cDNA für 3 min bei 95°C denaturiert, 3 min auf Eis inkubiert und ggf. ausfallende Präzipitate bei 42°C gelöst. Die Hybridisierung erfolgte nach Angaben des Microarray Herstellers (MWG Biotech) mit Hilfe eines Microarray Gene Fra- mes bei 42°C für 16 - 24 Stunden. Die anschließenden Waschschrte in 2×SSC, 0,1 % SDS (Waschpuffer1), 1×SSC (Waschpuffer2) und 0,5×SSC (Waschpuffer3) erfolgten nach Anga- ben des Herstellers. Die Auswertung wurde mit einem Affymetrix 428 Array Scanner durch- geführt.

Über die Analyse der erhaltenen Expressionsmuster konnten wichtige Informationen über die Wirkungsweise der HMGA-Proteine bzw. des HMGA1b-Proteins bei der Proliferation und Reaktivierung von Haut-Zellen gewonnen werden. Das Ergebnis der Auswertung zeigte die Wirkung der Zugabe des HMGA1b-Proteins auf die Genexpression des Zielgewebes über die Interaktion des HMGA1b-Proteins mit seinen Partnern auf Protein-DNA sowie Protein- Protein Ebene. Über diese Mechanismen der Interaktionen des Proteins wird das Expressi- onsmuster einer Reihe von Genen, die an der Wundheilung sowie der Regeneration der Haut beteiligt sind, reguliert. Über den Nachweis der Re-Expression fetaler Genen in adultem Ge- webe konnte die bedeutende Rolle der HMGA-Proteine bzw. des HMGA1b-Proteins bei der Geweberegeneration der Haut sowohl auf dem Gebiet der Wundheilung als auch für das Anti- Aging, d. h. für die Gewebeverjüngung verifiziert werden.

Die in der vorangehenden Beschreibung, den Ansprüchen, den Zeichnungen sowie dem Se- quenzprotokoll, das Teil der Beschreibung sein soll, offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination zur Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

# BOHMANN & LOOSEN

## Anwaltssozietät

BOHMANN & LOOSEN, Sonnenstr. 8, 80331 München

Deutsches Patent- und Markenamt

80297 München

Patentanwalt – European Patent Attorney  
Dr. Armin K. Bohmann, Dipl.-Biol.\*<sup>1</sup>

Rechtsanwalt  
Peter Loosen, LL.M.<sup>2</sup>

\*Zugelassener Vertreter vor dem Europäischen Markenamt, Alicante  
Professional Representation at the Community Trademark Office, Alicante

Zustelladresse:  
Sonnenstr. 8  
D-80331 München

Unser Zeichen  
Our ref

B 10028

Ihr Zeichen  
Your ref

Neuanmeldung  
(Patent)

Datum  
Date

03. Januar 2003

**alcedo biotech GmbH, Leobener Str. ZHG, 28359 Bremen**

**Verwendung DNA-bindender Proteine zum Aufbau von Geweben**

### Ansprüche

1. Verwendung, insbesondere in vitro, einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

2. Verwendung, insbesondere in vitro, einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Entdifferenzierung von Zellen und Reprogrammierung von Zellen umfasst,



für Gewebeaufbau und/oder Geweberegeneration, insbesondere beruhend auf der Grundlage einer Entdifferenzierung und/oder Differenzierung des aufzubauenden oder zu regenerierenden Gewebes,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst. . . .

3. Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt zur Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration erforderlich macht, Wundheilung erforderlich macht, die mit Gewebealterung einhergeht, Wundheilungsstörung, Herzinfarkt, die Zahn- und Knochenimplantate erforderlich macht,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

4. Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt zur Herstellung eines kosmetischen Produktes, bevorzugterweise eines kosmetischen Produktes für die Geweberegeneration, Wundheilung, Gewebealterungsverhinderung und/oder Gewebeverjüngung,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-Protein umfasst.

5. Verwendung einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung einer Krankheit, wobei die Krankheit ausgewählt ist aus der Gruppe, die akute Wunden und chronische Wunden umfasst,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die akute Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die akute traumatisch bedingte Wunden, thermische Wunden, chemische Wunden und OP-Wunden umfasst.

7. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die chronische Wunde eine solche ist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die Decubitus, Ulcus cruris, Ulcus cruris venosum, Ulcus cruris arteriosum, diabetische Ulcus, Decubitalulcus, chronische posttraumatische Wunde und diabetischer Fuß umfasst.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das basische DNA-bindende Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, die High Mobility Group-Proteine umfasst.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA, HMGB und HMGN umfasst.

10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass das High Mobility Group-Protein ein Protein der HMGA-Familie ist.

11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGA1a, HMGA1b und HMGA2 umfasst.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe der Nukleinsäuren, die Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO. 31 bis SEQ ID NO. 64 und deren jeweiligen Derivate umfasst.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Translationsprodukt aus der Gruppe ausgewählt ist, die Polypeptide mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1 bis SEQ ID NO. 30 und deren jeweilige Derivate umfasst.

14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Protein eine Modifikation aufweist, wobei die Modifikation aus der Gruppe ausgewählt ist, die Phosphorylierung und Acetylierung umfasst.

15. Verfahren zur Regeneration von Gewebe umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Gewebes oder eines Teils davon,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt und
- c) Inkubieren des Gewebes und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst, und optional

- d) Erhalten oder Wiedergewinnen des regenerierten Gewebes oder einer Zwischenstufe davon.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass es ein in vitro-Verfahren ist.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass das zu regenerierende Gewebe verschieden oder identisch ist von dem in Schritt a) bereitgestellten Gewebe.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das zu regenerierende Gewebe und/oder das in Schritt a) bereitgestellte Gewebe unabhängig voneinander ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Hautgewebe, Fettgewebe, Knorpelgewebe, Muskelgewebe, Zellen des Blutes und des Blutbildes und Nervenzellen umfasst.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

20. Verfahren zur Entdifferenzierung und/oder Reprogrammierung von Zellen umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen einer oder mehrerer Zellen,
- b) Zugabe einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, und
- c) Inkubieren der Zelle und der Nukleinsäuren, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

21. Verfahren nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren ein in vitro-Verfahren ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren weiterhin den Schritt umfasst:

- d) Erhalten einer entdifferenzierten und/oder reprogrammierten Zelle.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass die entdifferenzierte Zelle(n) und/oder reprogrammierte Zelle(n) und/oder die gemäß Schritt a) bereitgestellte(n) Zelle(n) unabhängig voneinander ausgewählt ist/sind aus der Gruppe, die Zellen der Epidermis, Zellen der Haut, Zellen des Fettgewebes, Zellen des Knorpelgewebes, Zellen des Muskelgewebes, Zellen des Blutes, Zellen des blutbildenden Gewebes und Nervenzellen umfasst.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

25. Pharmazeutische Formulierung umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben, und einen pharmazeutisch geeigneten Träger.

26. Trägermaterial umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

27. Trägermaterial nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial aus einem Material besteht, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Zellulose, Agarose, Kollagen, Silikon, Silicium, Kunststoffe, Gele, Hydrogele, Matrices basierend auf Fibrin, Kustseidenfasern, Hydrokolloide, Lipokolloide, Polyurethan, Polyurethanharz, Gips, synthetische Biomaterialien, thermoplastische Kunststoffe, Zinkleim, Polsterschaum, Polyisobutylene, Puffer, Stabilisatoren, Bakteriostatika und Feuchthaltemittel umfasst.

28. Trägermaterial nach Anspruch 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass das Trägermaterial als Implantat oder zur Wundheilung dient.

29. Wundabdeckungsmaterial umfassend ein Basisdeckmaterial und eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

30. Wundabdeckungsmaterial nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Deckmaterial aus der Gruppe ausgewählt ist, die Hydrokolloid-Verbände, Calciumalginat-Verbände, Aktivkohlekompressen/auflagen, Schaumstoffwundaufgaben, Folienverbände, Transparentverbände, Silikonschaumverbände, Vliesstoffwundaufgaben, Hydrozelluläre Wundverbände, Hydroselektive Wundaufgaben, Absorbierende Wundkissen, Sprühverbände, Kunstseidengaze, Baumwollgaze, Paraffingazeverbände, silberbeschichtete Wundverbände und Hydropolymer-/Schaumverbände umfasst.

31. Kosmetische Formulierung umfassend eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt, wobei die Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und /oder deren Translationsprodukt ein(e) solche(s) ist, wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben, und eine Trägerphase, wobei die Trägerphase aus der Gruppe ausgewählt ist, die Cremes, Fettsalben, Emulsionen (Öl in Wasser (O/W); Wasser in Öl (W/O); Wasser in Öl in Wasser (W/O/W)), Mikroemulsionen, modifizierte Emulsionen, Nanopartikel/Nanoemulsionen, Liposomen, Hydrodispersionsgele (Hydrogele, Alkoholgele, Lipogele, Tensidgele), Gel-Creme, Lotionen, Öle/Ölbäder und Sprays umfasst.

32. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;

b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung; und

c) Testen der Kandidaten-Verbindung und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem verursachten Reaktion.

33. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;

b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung;

c) Testen der Referenzverbindung im Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;

d) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung;

e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion; und

f) Vergleich der Reaktion von der Referenz-Verbindung im Testsystem mit der Reaktion von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem.

34. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;

b) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung, wobei die Referenz-Verbindung eine Markierung trägt;

c) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Referenz-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;

d) Bereitstellen der Kandidaten-Verbindung; und

e) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Referenz-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Referenz-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Referenz-Verbindung bestimmt wird.

35. Verfahren zum Screenen einer Verbindung zur Förderung und/oder Inhibierung eines Prozesses, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Bereitstellen eines Testsystems für den Prozess;
- b) Bereitstellen einer Kandidaten-Verbindung, wobei die Kandidaten-Verbindung eine Markierung trägt;
- c) Testen der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem und Bestimmen der von der Kandidaten-Verbindung im Testsystem verursachten Reaktion;
- d) Bereitstellen einer Referenz-Verbindung; und
- e) Testen der Referenz-Verbindung in dem Testsystem, wobei das Testsystem die Kandidaten-Verbindung enthält, und Bestimmen der Reaktion des Testsystems, wobei die Menge an freigesetzter Kandidaten-Verbindung und/oder freigesetzter Markierung der Kandidaten-Verbindung bestimmt wird.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass das Testsystem ein *in vitro* Testsystem oder ein *in vivo* Testsystem ist.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Förderung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zur Förderung des Prozesses ist, wenn die Reaktion der Kandidaten-Verbindung in dem Testsystem gleich oder stärker ist als die Reaktion der Referenz-Verbindung.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion von der Referenz-Verbindung und/oder der Kandidaten-Verbindung eine Inhibierung des Prozesses ist, und wobei bevorzugterweise die Kandidaten-Verbindung eine Verbindung zum



Inhibieren des Prozesses ist, wenn die von der Kandidaten-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems eine geringere Reaktion ist als die von der Referenz-Verbindung verursachte Reaktion des Testsystems.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 32 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass die Referenz-Verbindung eine Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt ist, wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindenden Proteine umfasst, insbesondere wie in einem der vorangehenden Ansprüche beschrieben.

---

Verwendung DNA-bindender Proteine zum Aufbau von Geweben

---

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung, insbesondere in vitro, einer Nukleinsäure, deren Transkriptionsprodukt und/oder deren Translationsprodukt für einen Prozess, wobei der Prozess ausgewählt ist aus der Gruppe, die Geweberegeneration, Wundheilung, Zellmobilität, Angiogenese im Wundbett, Epithelisierung, Gewebealterung, Verhinderung der Gewebealterung, Gewebeverjüngung, Vaskularisierung bei Herzinfarkt und Einheilung bei Zahn- und Knochenimplantaten umfasst,

wobei die Nukleinsäure ausgewählt ist aus der Gruppe, die Gene für basische DNA-bindende Proteine umfasst.

# Erhöhung der Mitoserate durch HMGA1a

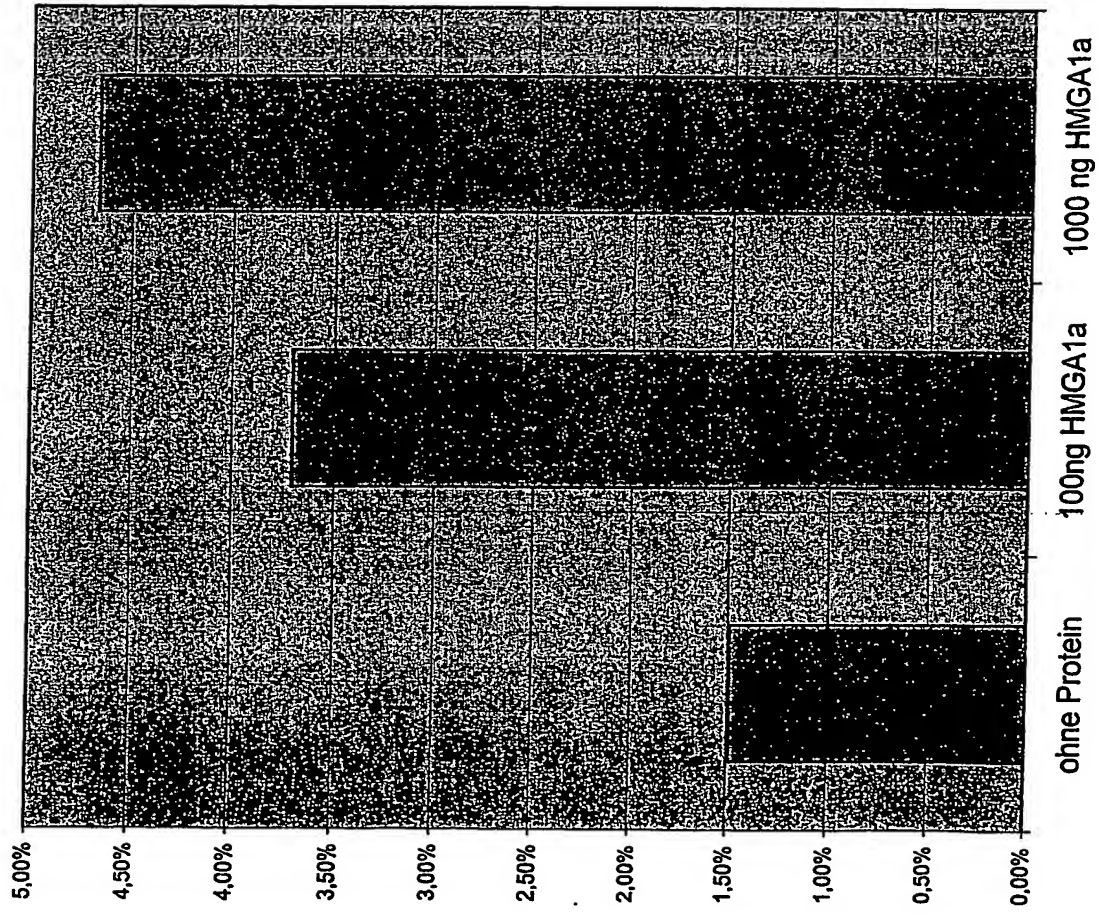


Fig. 1

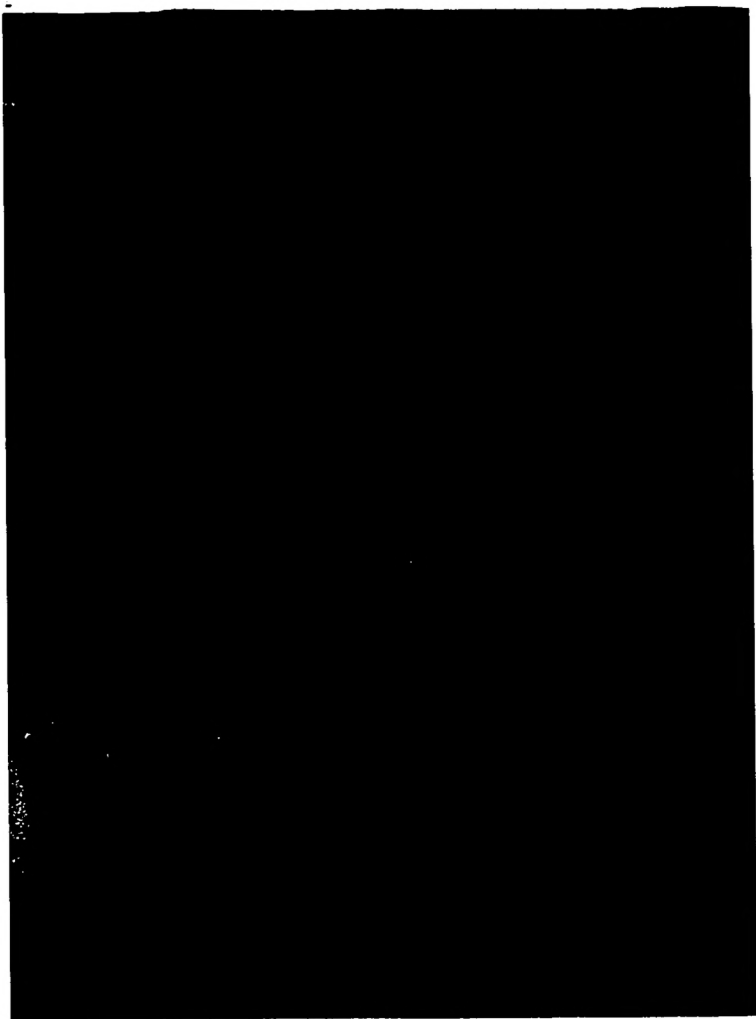


Fig. :



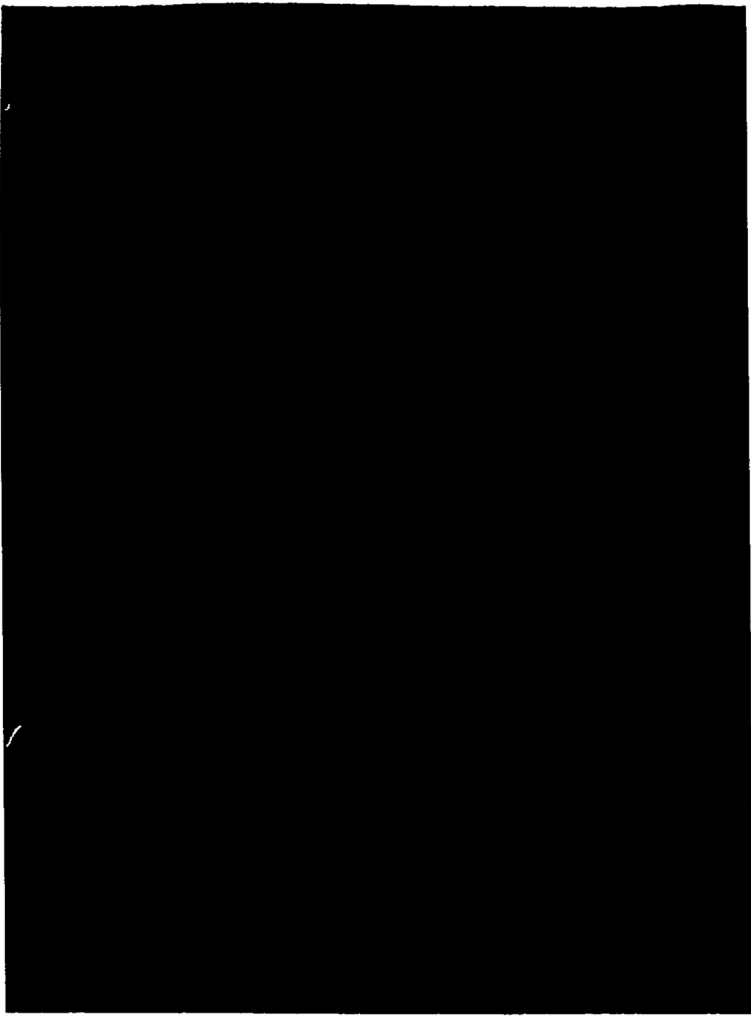


Fig.



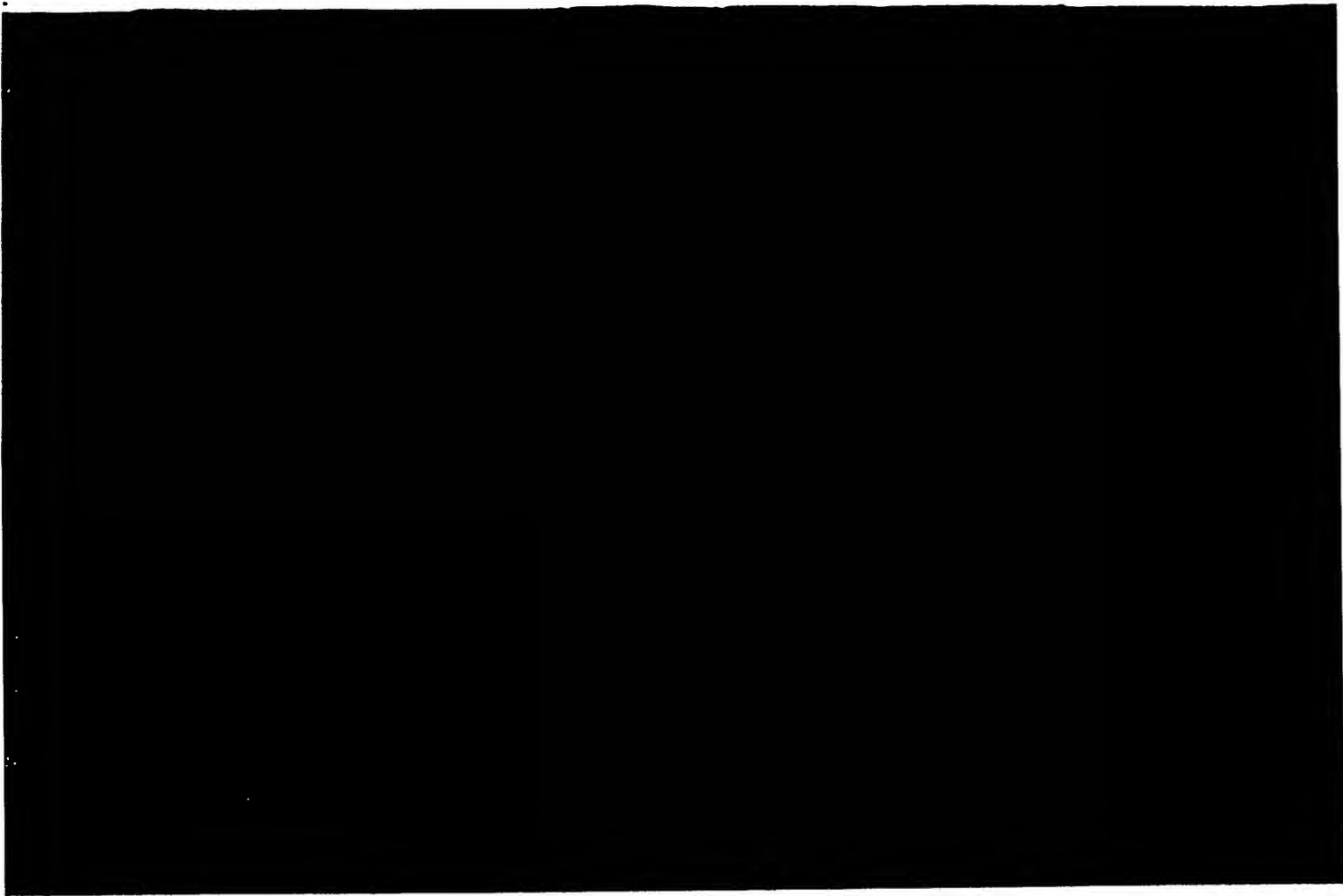


Fig. 4



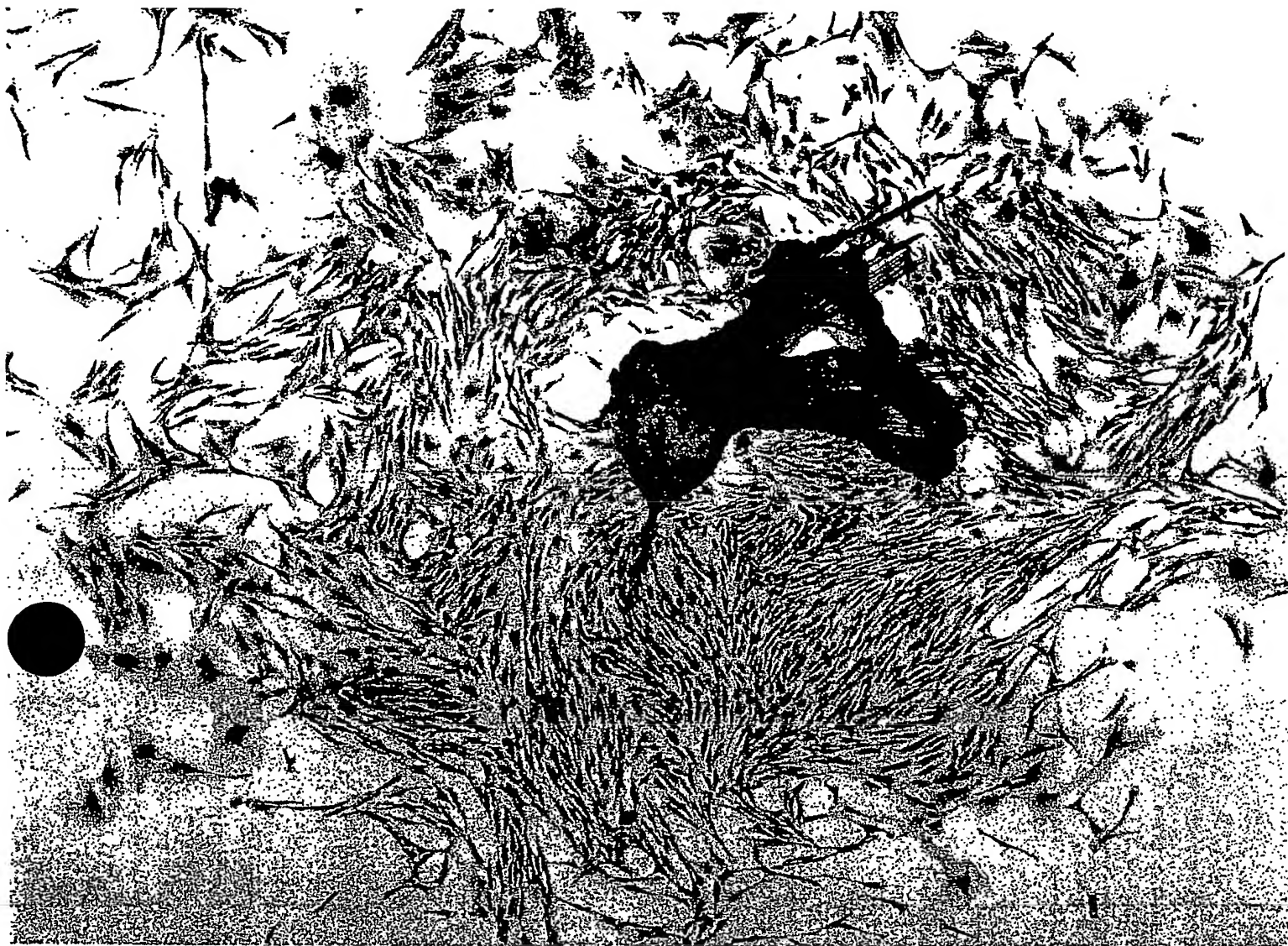


Fig. 5

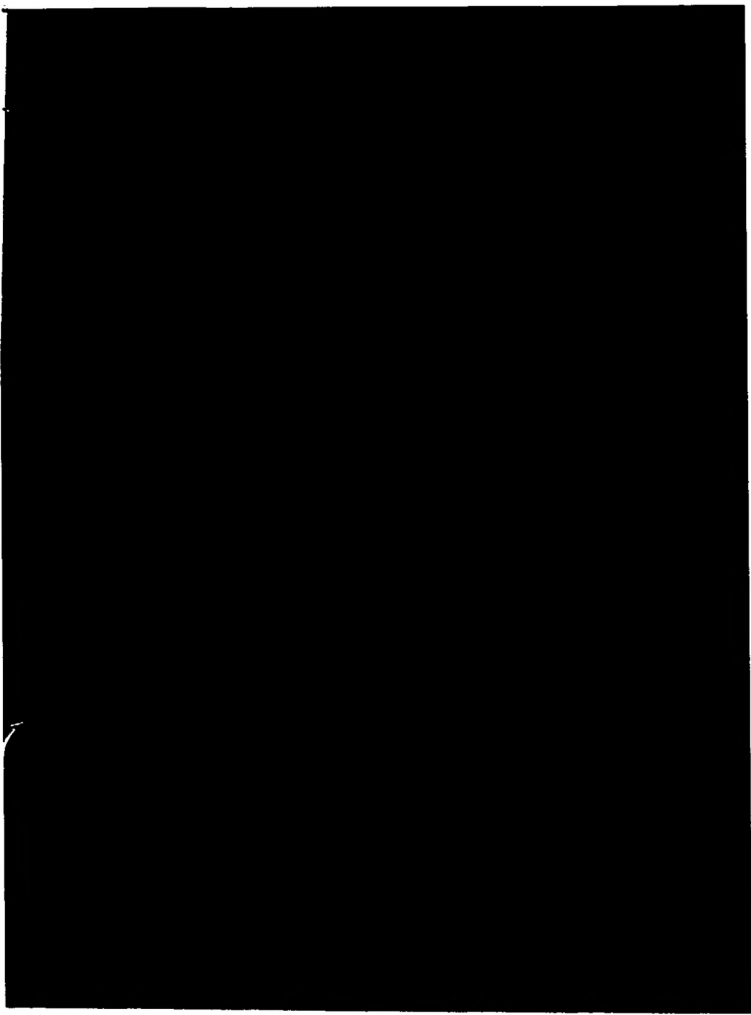


Fig.





# Sequenzprotokoll

<110> alcedo biotech GmbH

<120> Verwendung DNA-bindender Proteine zum Aufbau von Geweben

<130> B 10028

<160> 64

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln  
5 10 15

Glu Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln  
20 25 30

Pro Pro Val Ser Pro Gly Thr Ala Leu Val Gly Ser Gln Lys Glu Pro  
35 40 45

Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser  
50 55 60

Lys Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr Thr Thr Pro Gly  
65 70 75 80

Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu Lys Glu Glu Glu Glu  
85 90 95

Gly Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln  
100 105

<210> 2

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Glu Ser Ser Ser Lys Ser Ser Gln Pro Leu Ala Ser Lys Gln  
1 5 10 15

Glu Lys Asp Gly Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys Gln  
20 25 30

Pro Pro Lys Glu Pro Ser Glu Val Pro Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly

35

40

45

Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Gly Ala Ala Lys Thr Arg Lys Thr  
 50 55 60

Thr Thr Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys Leu Glu  
 65 70 75 80

Lys Glu Glu Glu Glu Gly Ile Ser Gln Glu Ser Ser Glu Glu Glu Gln  
 85 90 95

<210> 3  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Glu Glu  
 85 90 95

Thr Glu Glu Thr Ser Ser Gln Glu Ser Ala Glu Glu Asp  
 100 105

<210> 4  
 <211> 83  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
 65 70 75 80

Arg Lys Trp

<210> 5  
 <211> 90  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
 5 70 75 80

Arg Lys Trp Glu Glu Phe Tyr Ile Ala Ala  
 85 90

<210> 6  
 <211> 96  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Thr Ile Ala Leu Cys Thr His Trp Ile Asn Ile Cys  
85 90 95

<210> 7

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr  
1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro  
20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg  
35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala  
50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro  
70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys  
85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys  
100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys  
115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr  
130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala  
145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val  
 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu  
 180 185 190

Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Asp Glu  
 195 200 205

Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu  
 210 215

<210> 8

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Ala Gly Val Gln Trp Tyr Asn Leu Gly Ser Leu Gln Pro  
 85 90 95

Pro Pro Pro Arg Phe Lys Gln Phe Ser Cys Leu Arg Leu Leu Ser Ser  
 100 105 110

Trp Asp Tyr Arg His Pro Pro Pro His Pro Ala Asn Phe Cys Ile Phe  
 115 120 125

Ser Arg Asp Arg Val Ser Pro Cys Trp Pro Gly Trp Ser Arg Thr Pro  
 130 135 140

Asp Leu Arg  
 145

<210> 9  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Asp Asn Leu Leu Pro Arg Thr Ser Ser Lys Lys Lys Thr  
 85 90 95

Ser Leu Gly Asn Ser Thr Lys Arg Ser His  
 100 105

<210> 10  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Trp Leu Met Lys Ser Pro Cys Trp  
85 90

<210> 11  
<211> 96  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Tyr Ser  
85 90 95

<210> 12  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Val Asn

85

90

95

Val Ala Leu Pro Gly Lys Asp His Pro Gly Asn Leu Ile Tyr Leu Leu  
 100 105 110

Phe Ser Lys Asn Ala Thr  
 115

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 95

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 13

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala  
 50 55 60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
 65 70 75 80

Arg Lys Trp Pro Gln Gln Val Val Gln Lys Lys Pro Ala Gln Asp  
 85 90 95

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 14

Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 15

Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly  
 1 5 10



<210> 16  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 16

Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys  
 1 5 10

<210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 17

Thr Glu Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys  
 5 10

<210> 18  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Thr Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly  
 1 5 10

<210> 19  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Thr Pro Gly Arg Lys Pro Arg Gly Arg Pro Lys Lys  
 1 5 10

<210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro Arg Lys  
 1 5 10

<210> 21  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Pro Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Lys Gly  
1 5 10

<210> 22  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 22

Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro Arg Lys Trp Pro Gln Gln  
1 5 10 15

Val Val Gln Lys Lys  
20

<210> 23  
<211> 78  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 23

Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln  
1 5 10 15

Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn  
20 25 30

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser  
35 40 45

Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala  
50 55 60

Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly  
65 70 75

<210> 24  
<211> 71  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 24

Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg  
1 5 10 15

Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu  
20 25 30

Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu  
35 40 45

Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu  
 50 55 60

Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile  
 65 70

<210> 25  
 <211> 73  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln  
 1 5 10 15

Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn  
 20 25 30

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser  
 35 40 45

Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala  
 50 55 60

Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr  
 65 70

<210> 26  
 <211> 75  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser  
 1 5 10 15

Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly  
 20 25 30

Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp  
 35 40 45

Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr  
 50 55 60

Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly  
 65 70 75

<210> 27  
 <211> 69  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg  
 1 5 10 15

Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala  
 20 25 30

Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln  
 35 40 45

Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp  
 50 55 60

Ile Ala Ala Tyr Arg  
 65

<210> 28  
 <211> 49  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg  
 1 5 10 15

Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala  
 20 25 30

Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln  
 35 40 45

Pro

<210> 29  
 <211> 181  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Glu Glu His Lys Lys Lys Asn Pro Asp Ala Ser Val Lys Phe Ser Glu  
 1 5 10 15

Phe Leu Lys Lys Cys Ser Glu Thr Trp Lys Thr Ile Phe Ala Lys Glu

20

25

30

Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Ala His Tyr Glu  
 35 40 45

Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro Pro Lys Gly Glu Lys Lys Lys Lys  
 50 55 60

Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Leu Ala Phe Phe Leu  
 65 70 75 80

Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu  
 85 90 95

Ser Ile Asp Asp Val Val Lys Lys Leu Ala Gly Met Trp Asn Asn Thr  
 100 105 110

Ala Ala Ala Asp Lys Gln Phe Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys  
 115 120 125

Glu Lys Tyr Lys Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro  
 130 135 140

Asn Ser Ala Lys Lys Arg Val Val Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys  
 145 150 155 160

Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Glu Gln Glu Glu Glu Asn Glu  
 165 170 175

Glu Asp Asp Asp Lys  
 180

<210> 30  
 <211> 225  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Met Ser Ala Arg Gly Glu Gly Ala Gly Gln Pro Ser Thr Ser Ala Gln  
 1 5 10 15

Gly Gln Pro Ala Ala Pro Ala Pro Gln Lys Arg Gly Arg Gly Arg Pro  
 20 25 30

Arg Lys Gln Gln Gln Glu Pro Thr Gly Glu Pro Ser Pro Lys Arg Pro  
 35 40 45

Arg Gly Arg Pro Lys Gly Ser Lys Asn Lys Ser Pro Ser Lys Ala Ala

50

55

60

Gln Lys Lys Ala Glu Ala Thr Gly Glu Lys Arg Pro Arg Gly Arg Pro  
65 70 75 80

Arg Lys Trp Asn Thr Leu Glu Gln Cys Asn Val Cys Ser Lys Pro Ile  
85 90 95

Met Glu Arg Ile Leu Arg Ala Thr Gly Lys Ala Tyr His Pro His Cys  
100 105 110

Phe Thr Cys Val Met Cys His Arg Ser Leu Asp Gly Ile Pro Phe Thr  
115 120 125

Val Asp Ala Gly Gly Leu Ile His Cys Ile Glu Asp Phe His Lys Lys  
130 135 140

Phe Ala Pro Arg Cys Ser Val Cys Lys Glu Pro Ile Met Pro Ala Pro  
145 150 155 160

Gly Gln Glu Glu Thr Val Arg Ile Val Ala Leu Asp Arg Asp Phe His  
165 170 175

Val His Cys Tyr Arg Cys Glu Asp Cys Gly Gly Leu Leu Ser Glu Gly  
180 185 190

Asp Asn Gln Gly Cys Tyr Pro Leu Asp Gly His Ile Leu Cys Lys Thr  
195 200 205

Cys Asn Ser Ala Arg Ile Arg Val Leu Thr Ala Lys Ala Ser Thr Asp  
210 215 220

Leu  
225

<210> 31  
<211> 1873  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<223> NCIB Accession No. M23614

<400> 31  
gagcacgcgg cgggcgcggt ctctgagcgc ctctgctctc tctcccggtt tcagatccgc 60  
atttgctacc agcggcgggc gcgcggagcc aggcgggtcc tcagcgccca gcacgggtcc 120  
cggcaaccgc gagcgcgcac cgcagccggc ggccgagctc gcgcatccca gccatcactc 180

ttccacctgc tccttagaga agggaagatg agtgagtcga gctcgaagtc cagccagccc 240  
 ttggcctcca agcaggaaaa ggacggcact gagaagcggg gccggggcag gccgcgcaag 300  
 cagcctccgg tgagtcccgg gacagcgctg gtagggagtc agaaggagcc cagcgaagtg 360  
 ccaacaccta agagacctcg gggccgacca aagggaagca aaaacaaggg tgctgccaa 420  
 acccgaaaa ccaccacaac tccaggaagg aaaccaaggg gcagacccaa aaaactggag 480  
 aaggaggaag aggagggcat ctgcgaggag tcctcggagg aggagcagtg acccatgcgt 540  
 gccgcctgct cctcactgga ggagcagctt ccttctggga ctggacagct ttgctccgct 600  
 cccaccgccc ccgccccttc ccaggccca ccatcaccac cgcctctggc cgccaccccc 660  
 atcttccacc tgtgccctca ccaccacact acacagcaca ccagccgctg caggggctcc 720  
 catgggcctg agtggggagc agttttcccc tggcctcagt tcacagctcc ccccgccac 780  
 cagcatac acacatgccc tcctggacaa ggctaacatc ccacttagcc gcaccctgca 840  
 cctgctgcgt cccactccc ttggtggtgg ggacattgct ctctgggctt ttggtttggg 900  
 ggcgcctct ctgctccttc actgttccct ctggcttccc atagtggggc ctgggagggg 960  
 tcccctggcc ttaaaagggg cccaagccat ctcatcctgg cagccctac tccactgccc 1020  
 tggcacagca ggtgtggcca atggaggggg gtgctggccc ccaggattcc ccagccaaa 1080  
 ctgtctttgt caccacgtgg ggtcacttt tcctccttc ccaacttccc tagtccccgt 1140  
 actaggttgg acagccccct tcggctacag gaaggcagga ggggtgagtc ccctactccc 1200  
 tcttactgt ggccacagcc cccttgccct ccgctggga tctgagtaca tattgtggtg 1260  
 atggagatgc agtcacttat tgtccagggt aggcccaaga gccctgtggc cgcacctgag 1320  
 gtgggctggg gctgctcccc taaccctact ttcggtccgc cactcagcca tttccccctc 1380  
 ccagatggg gcaccaataa caaggagctc accctgcccg ctcccaacct ccctcctgct 1440  
 cctccctgcc cccaagggt ctgggttcca ttttctctct gttcaciaaac tacctctgga 1500  
 cagttgtgtt gttttttgtt caatgttcca ttcttcgaca tccgtcattg ctgctgctac 1560  
 cagcgccaaa tgttcatcct cattgcctcc tgttctgccc acgatccct ccccaagat 1620  
 actctttgtg ggaagagggg ctggggcatg gcaggctggg tgaccgacta cccagtccc 1680  
 agggaagggt gccctgcccc taggatgctg cagcagagt agcaaggggg ccggaatcga 1740  
 ccataaaggg tgtaggggcc acctcctccc cctgttctgt tggggagggg tagcatgat 1800  
 ttgtcccagc ctggggctcc ctctctgggt tcctatttgc agttacttga ataaaaaaaa 1860  
 tatccttttc tgg 1873

<210> 32  
 <211> 324  
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

```

atgagtgagt cgagctcgaa gtccagccag cccttggcct ccaagcagga aaaggacggc      60
actgagaagc ggggccgggg caggccgcgc aagcagcctc cggtgagtcc cgggacagcg      120
ctggtaggga gtcagaagga gcccagcgaa gtgccaacac ctaagagacc tcggggccga      180
ccaaagggaa gcaaaaacaa ggggtgctgcc aagaccgcga aaaccaccac aactccagga      240
aggaaaccaa ggggcagacc caaaaaactg gagaaggagg aagaggaggg catctcgag      300
gagtcctcgg aggaggagca gtga      324

```

<210> 33

<211> 1875

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc\_feature

<223> NCIB Accession No. M23616

<400> 33

```

gctttttaag ctcccctgag ccggtgctgc gctcctctaa ttgggactcc gagccggggc      60
tatttctggg ctggcgcggc tccaagaaga tccgcatttg ctaccagcgg cggccgcgcg      120
gagccaggcc ggtcctcagc gccagcacg gctcccggca acccgagcgg cgcaccgcag      180
ccggcgggccg agctcgcgca tcccagccat cactcttcca cctgctcctt agagaaggga      240
agatgagtga gtcgagctcg aagtccagcc agcccttggc ctccaagcag gaaaaggacg      300
gcactgagaa gcgggggccg ggcaggccgc gcaagcagcc tccgaaggag ccagcgaag      360
tgccaacacc taagagacct cggggccgac caaaggggaag caaaaacaag ggtgctgcca      420
agaccggaa aaccaccaca actccaggaa ggaaaccaag gggcagacc aaaaaactgg      480
agaaggagga agaggagggc atctcgcagg agtcctcgga ggaggagcag tgacccatgc      540
gtgccgcctg ctctcactg gaggagcagc ttccttctgg gactggacag ctttgctccg      600
ctcccaccgc ccccgccct tcccaggcc caccatcacc accgcctctg gccgccacc      660
ccatcttcca cctgtgccct caccaccaca ctacacagca caccagccgc tgcaggggct      720
cccatgggcc tgagtgggga gcagttttcc cctggcctca gttcacagct ccccccggcc      780
accacgcat acacacatgc cctcctggac aaggctaaca tcccacttag ccgcaccctg      840
cacctgctgc gtcccactc ccttgggtgg ggggacattg ctctctgggc ttttggtttg      900
ggggcgccct ctctgctcct tcaactgttc ctctggcttc ccatagtggg gcctgggagg      960
gttcccctgg ccttaaaagg ggccaagcc atctcactc ggcacgccct actccactgc      1020
cctggcacag caggtgtggc caatggaggg ggggtgctggc cccagagatt ccccagcca      1080

```



aactgtcttt gtcaccacgt ggggctcact tttcatcctt ccccaacttc cctagtcccc 1140  
gtactagggtt ggacagcccc ctteggctac aggaaggcag gaggggtgag tcccctactc 1200  
cctcttcact gtggccacag cccctctgcc ctccgcctgg gatctgagta catattgtgg 1260  
tgatggagat gcagtcactt attgtccagg tgaggcccaa gagccctgtg gccgcacctg 1320  
aggtgggctg gggctgctcc cctaacccta ctttcgttcc gccactcagc catttcccc 1380  
tcctcagatg gggcaccaat aacaaggagc tcacctgcc cgctcccaac cccctcctg 1440  
ctcctccctg cccccaagg ttctgggttc catttttctt ctgttcacaa actacctctg 1500  
gacagttgtg ttgttttttg ttcaatgttc cattcttcga catccgtcat tgctgctgct 1560  
accagcgcca aatgttcac ctcattgcct cctgttctgc ccacgatccc ctccccaag 1620  
atactctttg tgggaagagg ggctggggca tggcaggctg ggtgaccgac taccacgtc 1680  
tcagggaagg tggccctgcc cctaggatgc tgcagcagag tgagcaaggg ggcccgaatc 1740  
gaccataaag ggtgtagggg ccacctctc cccctgttct gttggggagg ggtagccatg 1800  
atttgtccca gcctggggct cctctctctg tttcctatct gcagttactt gaataaaaaa 1860  
aatatccttt tctgg 1875

<210> 34  
<211> 291  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 34  
atgagtgagt cgagctcgaa gtccagccag cccttggcct ccaagcagga aaaggacggc 60  
actgagaagc ggggccgggg caggccgcgc aagcagcctc cgaaggagcc cagcgaagtg 120  
ccaacaccta agagacctcg gggccgacca aagggaagca aaaacaaggg tgctgccaa 180  
cccgaaaaa ccaccacaac tccaggaagg aaaccaaggg gcagacccaa aaaactggag 240  
aaggaggaag aggagggcat ctgcaggag tcctcggagg aggagcagt a 291

<210> 35  
<211> 4111  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 35  
acacaccaca cacactcaca ctcacacaca ctcacacaca ctcatccct tgaatcttgg 60  
ggcaggaact cagaaaactt ccagcccggg cagcgcgcgc ttggtgcaag actcaggagc 120  
tagcagcccg tccccctcg actctccggg gccgcgcgtg cctgctcccg ccacctagg 180  
aggcgcgggtg ccaccacta ctctgtctc tgctgtgct ccgtgccga cctatcccg 240  
gcggagtctc cccatctctc tttgttttc gactgcccga ggcactttca atctcaatct 300  
cttctctctc tctctctc tctctgtc tctctctc tctctctc tctctctc 360

agggtggggg	gaagaggagg	aggaattctt	tccccgccta	acatttcaag	ggacacaatt	420
cactccaagt	ctcttccctt	tccaagccgc	ttccgaagtg	ctcccgggtgc	ccgcaactcc	480
tgatcccaac	ccgcgagagg	agcctctgcg	acctcaaagc	ctctcttctt	tctccctcgc	540
ttccctcctc	ctcttgctac	ctccacctcc	accgccacct	ccacctccgg	caccacacca	600
ccgcgcgcgc	cgccaccggc	agcgctcctt	cctctctctc	tcctcctccc	ctcttctctt	660
tttggcagcc	gctggacgtc	cgggtgtgat	ggtggcagcg	gcgggcagcct	aagcaacagc	720
agccctcgcg	gccccgcagc	tcgcgctcgc	ccgcgcggcg	tccccagccc	tatcacctca	780
tctcccgaaa	ggtgctgggc	agctccgggg	cggtcgaggc	gaagcggctg	cagcggcggg	840
agcggcggcg	ggaggcagga	tgagcgcacg	cggtgagggc	gcggggcagc	cgtccacttc	900
agcccaggga	caacctgccg	ccccagcgcc	tcagaagaga	ggacgcggcc	gccccaggaa	960
cagcagcaa	gaaccaaccg	gtgagccctc	tcctaagaga	cccaggggaa	gacccaaagg	1020
cagcaaaaac	aagagtccct	ctaaagcagc	tcaaaagaaa	gcagaagcca	ctggagaaaa	1080
acggccaaga	ggcagaccta	ggaaatggcc	acaacaagtt	gttcagaaga	agcctgctca	1140
ggaggaaaact	gaagagacat	cctcacaaga	gtctgccgaa	gaggactagg	gggcgcaacg	1200
ttcgattttct	acctcagcag	cagttggatc	ttttgaaggg	agaagacact	gcagtgacca	1260
cttattctgt	attgccatgg	tctttccact	ttcatctggg	gtgggggtggg	gtgggggtggg	1320
ggagggggggg	gtgggggtggg	gagaaatcac	ataaccttaa	aaaggactat	attaatcacc	1380
ttctttgtaa	tcccttcaca	gtcccagggt	tagtgaaaaa	ctgctgtaaa	cacaggggac	1440
acagcttaac	aatgcaactt	ttaattactg	ttttcttttt	tcttaacctc	ctaatagttt	1500
gttgatctga	taagcaagag	tgggcgggtg	agaaaaaccg	aattgggttt	agtcaatcac	1560
gcactgcat	gcaaacaaga	aacgtgtcac	acttgtgacg	tcgggcattc	atataggaag	1620
aacgcggtgt	gtaacactgt	gtacacctca	aataccaccc	caaccactc	cctgtagtga	1680
atcctctgtt	tagaacacca	aagataagga	ctagatacta	ctttctcttt	ttcgtataat	1740
cttgtagaca	cttacttgat	gatttttaac	tttttatctt	taaatgagac	gaaatgctga	1800
tgtatccttt	cattcagcta	acaaactaga	aaaggttatg	ttcatttttc	aaaaagggaa	1860
gtaagcaaac	aaatattgcc	aactcttcta	tttatggata	tcacacatat	cagcaggagt	1920
aataaattta	ctcacagcac	ttgttttcag	gacaacactt	cattttcagg	aaatctactt	1980
cctacagagc	caaaatgcc	tttagcaata	aataacactt	gtcagcctca	gagcatttaa	2040
ggaaactaga	caagtaaaat	tatcctcttt	gtaatttaat	gaaaaggtag	aacagaataa	2100
tgcatgatga	actcacctaa	ttatgagggt	ggaggagcga	aatctaaatt	tcttttgcta	2160
tagttataca	tcaatttaaa	aagcaaaaaa	aaaaaggggg	gggcaatctc	tctctgtgtc	2220

tttctctctc	tctctccctc	tccctctctc	ttttcatgtg	tatcagtttc	catgaaagac	2280
ctgaatacca	cttacctcaa	attaagcata	tgtgttactt	caagtaatac	gttttgacat	2340
aagatgggtg	accaaggtgc	ttttcttcgg	cttgagttca	ccatctcttc	attcaaactg	2400
cacttttagc	cagagatgca	atatatcccc	actactcaat	actacctctg	aatggtacaa	2460
cgaatttaca	gtctagtact	tattacatgc	tgctatacac	aagcaatgca	agaaaaaac	2520
ttactgggta	ggtgattcta	atcatctgca	gttctttttg	tacacttaat	tacagttaaa	2580
gaagcaatct	ccttactgtg	tttcagcatg	actatgtatt	tttctatggt	tttttaatta	2640
aaaattttta	aaatacttgt	ttcagcttct	ctgctagatt	tctacattaa	cttgaaaatt	2700
ttttaaccaa	gtcgctccta	ggttcttaag	gataattttc	ctcaatcaca	ctacacatca	2760
cacaagattt	gactgtaata	tttaaataat	accctccaag	tctgtacctc	aatgaattc	2820
tttaaggaga	tggactaatt	gacttgcaaa	gacctacctc	cagacttcaa	aaggaatgaa	2880
cttggttactt	gcagcattca	tttgtttttt	caatgtttga	aatagttcaa	actgcagcta	2940
accctagtca	aaactatttt	tgtaaaagac	atttgataga	aaggaacacg	tttttacata	3000
cttttgcaaa	ataagtaa	aataaataaa	ataaagccaa	ccttcaaaga	acttgaagct	3060
ttgtagggtga	gatgcaacaa	gccctgcttt	tgcataatgc	aatcaaaaat	atgtgttttt	3120
aagattagtt	gaatataaga	aatgcttga	caaataat	catgtat	acacaaatgt	3180
gatttttgta	atatgtctca	accagattta	ttttaaacgc	ttcttatgta	gagtttttat	3240
gcctttctct	cctagtgagt	gtgctgactt	tttaacatgg	tattatcaac	tggggccagga	3300
ggtagtttct	catgacggct	tttgtcagta	tggtttttag	tactgaagcc	aatgaaact	3360
caaaaccatc	tctcttccag	ctgcttcagg	gaggtagttt	caaaggccac	atacctctct	3420
gagactggca	gacgctcac	tgttgtgaat	caccaaagga	gctatggaga	gaattaaaac	3480
ccaacattac	tgtaacttgt	gcgttaata	agcaaataaa	cagtggctca	taaaaataaa	3540
agtcgcattc	catatctttg	gatgggcctt	ttagaaacct	cattggccag	ctcataaaat	3600
ggaagcaatt	gctcatgttg	gccaaacatg	gtgcaccgag	tgatttccat	ctctggtaaa	3660
gttacacttt	tatttctctg	atgttgta	atcaaaacac	actactacct	cttaagtccc	3720
agtatacctc	atttttcata	ctgaaaaaaa	aagcttgtgg	ccaatggaac	agtaagaaca	3780
tcataaaatt	tttatatata	tagtttattt	ttgtgggaga	taaattttat	aggactgttc	3840
tttgctgttg	ttggtcgcag	ctacataaga	ctggacattt	aacttttcta	ccatttctgc	3900
aagttaggta	tgtttgcagg	agaaaagtat	caagacgttt	aactgcagtt	gactttctcc	3960
ctgttccttt	gagtgtcttc	taactttatt	ctttgttctt	tatgtagaat	tgctgtctat	4020
gattgtactt	tgaatcgctt	gcttggtgaa	aatatttctc	tagtgtatta	tcactgtctg	4080
ttctgcacaa	taaacataac	agcctctgtg	a			4111

<210> 36  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 36  
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60  
 gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120  
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180  
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240  
 aggaaatggc cacaacaagt tgttcagaag aagcctgctc aggaggaaac tgaagagaca 300  
 tcctcacaag agtctgccga agaggactag 330

<210> 37  
 <211> 252  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 37  
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60  
 gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120  
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180  
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240  
 aggaaatggg ga 252

<210> 38  
 <211> 273  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 38  
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60  
 gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120  
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180  
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240  
 aggaaatggg aggagtttta cattgcagct tag 273

<210> 39  
 <211> 291  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 39  
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60

```

gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120
ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240
aggaaatggc ctactattgc actttgcaca cactggataa acatctgctg a 291

```

```

<210> 40
<211> 1207
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature.
<223> NCIB Accession No. NM_002128

```

```

<400> 40
agacagcgc cggggcaagt gagagccgga cgggcactgg gcgactctgt gcctcgctga 60
gaaaaataa ctaaakatgg gcaaaggaga tcctaagaag ccgagaggca aaatgtcatc 120
atatgcattt tttgtgcaaa cttgtcggga ggagcataag aagaagcacc cagatgcttc 180
agtcaacttc tcagagtttt ctaagaagtg ctcagagagg tggaagacca tgtctgctaa 240
agagaaagga aaatttgaag atatggcaaa ggcggacaag gcccgttatg aaagagaaat 300
gaaaacctat atccctccca aaggggagac aaaaaagaag ttcaaggatc ccaatgcacc 360
caagaggcct ccttcggcct tcttcctctt ctgctctgag tatcgcccaa aaatcaaagg 420
agaacatcct ggctgtcca ttggtgatgt tgcaagaaa ctgggagaga tgtggaataa 480
cactgctgca gatgacaagc agccttatga aaagaaggct gcgaagctga aggaaaaata 540
cgaaaaggat attgctgcat atcgagctaa aggaaagcct gatgcagcaa aaaagggagt 600
gtcaaggct gaaaaaagca agaaaaagaa ggaagaggag gaagatgagg aagatgaaga 660
gatgaggag gaggaggaag atgaagaaga tgaagatgaa gaagaagatg atgatgatga 720
ataagtgggt tctagcgcag ttttttttct ttgtctataa agcatttaac cccctgtac 780
acaactcact ccttttaaag aaaaaaattg aaatgtaagg ctgtgtaaga tttgttttta 840
aactgtacag tgtctttttt tgtatagtta acacactacc gaatgtgtct ttagatagcc 900
ctgtcctggg ggtattttca atagccacta accttgccct gtacagtatg ggggttgtaa 960
attggcatgg aaatttaaag caggttcttg ttggtgcaca gcacaaatta gttatatatg 1020
gggatggtag ttttttcac ttcagttgtc tctgatgcag cttatacgaa ataattgttg 1080
ttctgttaac tgaataccac tctgtaattg caaaaaaaaa aaaagttgca gctgttttgt 1140
tgacattctg aatgcttcta agtaaatata atttttttta ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200
aaaaaaaaa 1207

```

<210> 41  
 <211> 648  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 41  
 atgggcaaag gagatcctaa gaagccgaga ggcaaatgt catcatatgc attttttgtg 60  
 caaacttgtc gggaggagca taagaagaag caccagatg cttcagtcaa cttctcagag 120  
 ttttctaaga agtgctcaga gaggtggaag accatgtctg ctaaagagaa aggaaaattt 180  
 gaagatatgg caaaggcgga caaggcccgt tatgaaagag aaatgaaaac ctatatccct 240  
 cccaaagggg agacaaaaaa gaagttcaag gatcccaatg cacccaagag gcctccttcg 300  
 gccttcttcc tcttctgtc tgagtatcg ccaaaaatca aaggagaaca tcctggcctg 360  
 tccattggtg atgttgcgaa gaaactggga gagatgtgga ataactgc tgcagatgac 420  
 gaggcgcctt atgaaaagaa ggctgcgaag ctgaaggaaa aatacgaaaa ggatattgct 480  
 catatcgag ctaaaggaaa gcctgatgca gcaaaaaagg gagttgtcaa ggctgaaaaa 540  
 agcaaaaaa agaaggaaga ggaggaagat gaggaagatg aagaggatga ggaggaggag 600  
 gaagatgaag aagatgaaga tgaagaagaa gatgatgatg atgaataa 648

<210> 42  
 <211> 444  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 42  
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60  
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120  
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180  
 ctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240  
 aggaaatggg ctggagtgc gtggtacaat ctcggctcat tgcaacctcc acctcccagg 300  
 ttcaagcaat tctcctgcct caggctcctg agtagttggg attacaggca cccaccacca 360  
 caccagcta atttttgtat ttttagtaga gacagggttt caccatgttg gccaggctgg 420  
 tctcgaactc ctgacctcag gtga 444

<210> 43  
 <211> 321  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 43  
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60  
 gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120  
 ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180

tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240  
 aggaaatggg acaatctact accaagaacc agctccaaga agaaaacatc tctgggaaac 300  
 agtaccaaaa ggagtcactg a 321

<210> 44  
 <211> 279  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 44  
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60  
 gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120  
 ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180  
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240  
 ggaaatggg ggttgctaata gaagagcccc tgctggtga 279

<210> 45  
 <211> 291  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 45  
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60  
 gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120  
 ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180  
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240  
 aggaaatggc cacaacaagt tgttcagaag aagcctgctc agtattcctg a 291

<210> 46  
 <211> 357  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 46  
 atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60  
 gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120  
 ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180  
 tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240  
 aggaaatggc cacaacaagt tgttcagaag aagcctgctc aggtcaatgt tgccttgctt 300  
 gggaaggacc acccggggcaa tcttatatat ctactgttct ctaaaaatgc cacttag 357

<210> 47  
 <211> 288

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc 60

gccccagcgc ctcaagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc 120

ggtgagccct ctcctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc 180

tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct 240

aggaaatggc cacaacaagt tgttcagaag aagcctgctc aggactga 288

<210> 48

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 48

ctgagaagc ggggccgggg caggccgcgc aag 33

<210> 49

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

acacctaaga gacctcgggg ccgaccaaag gga 33

<210> 50

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 50

actccaggaa ggaaaccaag gggcagaccc aaaaaa 36

<210> 51

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

actgagaagc ggggccgggg caggccgcgc aag 33

<210> 52

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

acacctaaga gacctcgggg ccgaccaaag gga 33

<210> 53

<211> 36

<212> DNA



<213> Homo sapiens

<400> 53

actccaggaa ggaaaccaag gggcagaccc aaaaaa

36

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

cctcagaaga gaggacgagg cgcggcagg aag

33

<210> 55

<211> 33

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

tcctaaga gaccagggg aagacccaaa ggc

33

<210> 56

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 56

actggagaaa aacggccaag aggcagacct aggaaatggc cacaacaagt tggtcagaag

60

aag

63

<210> 57

<211> 234

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 57

taagaagc cgagaggcaa aatgtcatca tatgcatttt ttgtgcaaac ttgtcgggag

60

gagcataaga agaagcacc agatgcttca gtcaacttct cagagttttc taagaagtgc

120

tcagagaggt ggaaggtaag agggcttaaa acatgctaac aaggtaatta aaagacagtt

180

tccaattgag gatgcaaaaa aaagcctagt tggcattctc gtagtgggac gcta

234

<210> 58

<211> 213

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

ccgagaggca aaatgtcatc atatgcattt tttgtgcaaa cttgtcggga ggagcataag

60

aagaagcacc cagatgcttc agtcaacttc tcagagtttt ctaagaagtg ctcagagagg

120

tggaagacca tgtctgctaa agagaaagga aaatttgaag atatggcaaa ggcggacaag

180

gcccgttatg aaagagaaat gaaaacctat atc

213

<210> 59  
 <211> 219  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 59  
 cctaagaagc cgagaggcaa aatgtcatca tatgcatttt ttgtgcaaac ttgtcgggag 60  
 gagcataaga agaagcacc cagatgcttca gtcaacttct cagagttttc taagaagtgc 120  
 tcagagaggt ggaagaccat gtctgctaaa gagaaaggaa aatttgaaga tatggcaaag 180  
 gcggacaagg cccgttatga aagagaaatg aaaacctat 219

<210> 60  
 <211> 225  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 60  
 cccaatgcac ccaagaggcc tccttcggcc ttcttctct tctgctctga gtatcgccca 60  
 aaaatcaaag gagaacatcc tggcctgtcc attggtgatg ttgcgaagaa actgggagag 120  
 atgtggaata acactgctgc agatgacaag cagccttatg aaaagaaggc tgcgaagctg 180  
 aaggaaaaat acgaaaagga tattgctgca tatcgagcta aagga 225

<210> 61  
 <211> 207  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 61  
 cccaagaggc ctccttcggc cttcttcctc ttctgctctg agtatcgccc aaaaatcaaa 60  
 ggagaacatc ctggcctgtc cattggtgat gttgcgaaga aactgggaga gatgtggaat 120  
 aacactgctg cagatgacaa gcagccttat gaaaagaagg ctgcgaagct gaaggaaaaa 180  
 tacgaaaagg atattgctgc atatcga 207

<210> 62  
 <211> 147  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 62  
 cccaagaggc ctccttcggc cttcttcctc ttctgctctg agtatcgccc aaaaatcaaa 60  
 ggagaacatc ctggcctgtc cattggtgat gttgcgaaga aactgggaga gatgtggaat 120  
 aacactgctg cagatgacaa gcagcct 147

<210> 63  
 <211> 546  
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

gaggagcata agaagaagaa cccagatgct tcagtcaagt tctcagagtt tttaaagaag	60
tgctcagaga catggaagac catttttctgct aaagagaaag gaaaatttga agatatggca	120
aaggcggaca agggccatta tgaaagagaa atgaaaacct atatccctcc taaaggggag	180
aaaaaaaaaga agttcaagga tcccaatgca cccaagaggc ctcttttggc ctttttctg	240
ttctgctctg agtatcgccc aaaaatcaaa ggagaacatc ctggcctgtc cattgatgat	300
gttggtgaaga aactggcagg gatgtggaat aacaccgctg cagctgacaa gcagttttat	360
gaaaagaagg ctgcaaagct gaaggaaaaa tacaaaaagg atattgctgc atatcgagct	420
aaaggaaagc ctaattcagc aaaaaagaga gttgtcaagg ctgaaaaaag caagaaaaag	480
aaggaagagg aagaagatga agaggatgaa caagaggagg aaaatgaaga agatgatgat	540
aataa	546

<210> 64

<211> 678

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 64

atgagcgcac gcggtgaggg cgcggggcag ccgtccactt cagcccaggg acaacctgcc	60
gccccagcgc ctcagaagag aggacgcggc cgccccagga agcagcagca agaaccaacc	120
ggtgagccct ctctaagag acccagggga agacccaaag gcagcaaaaa caagagtccc	180
tctaaagcag ctcaaaagaa agcagaagcc actggagaaa aacggccaag aggcagacct	240
aggaaatgga atactctgga gcagtgcaat gtgtgttcca agcccatcat ggagcggatt	300
ctccgagcca cggggaaggc ctatcatcct cactgtttca cctgcgtgat gtgccaccgc	360
gcctggatg ggatccatt cactgtggat gctggcgggc tcattcactg cattgaggac	420
ttccacaaga aatttgcccc gcggtgttct gtgtgcaagg agcctattat gccagccccg	480
ggccaggagg agactgtccg tattgtggct ttggatcgag atttccatgt tcactgctac	540
cgatgcgagg attgcggtgg tctcctgtct gaaggagata accaaggctg ctacccttg	600
gatgggcaca tcctctgcaa gacctgcaac tctgcccga tcagggtgtt gaccgccaag	660
gcgagcactg acctttag	678

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**